

第38回補体シンポジウム・第12回日本生体防御学会

合同学術集会 抄録集



2001年 8月 京都

Bio DEFENCE Vol.12

Proceeding of the Complement Symposium Vol.38

第38回補体シンポジウム・第12回日本生体防御学会
合同学術集会 講演集

会 期：2001年8月24日(金)・25日(土)

会 場：京大会館

〒606-8305 京都市左京区吉田河原町15-9

〒960-1295 福島市光が丘1

福島県立医科大学生化学第2講座

補体研究会学術集会長 藤田禎三

TEL 024-548-2111 FAX 024-548-6760

〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53

京都大学再生医科学研究所再生免疫学分野

日本生体防御学会学術集会長 桂 義元

TEL 075-751-3845 FAX 075-751-4648

会場案内

京大会館

京都市左京区吉田河原町15-9

TEL 075-751-8311

FAX 075-761-5403

(交通, 最寄り駅)

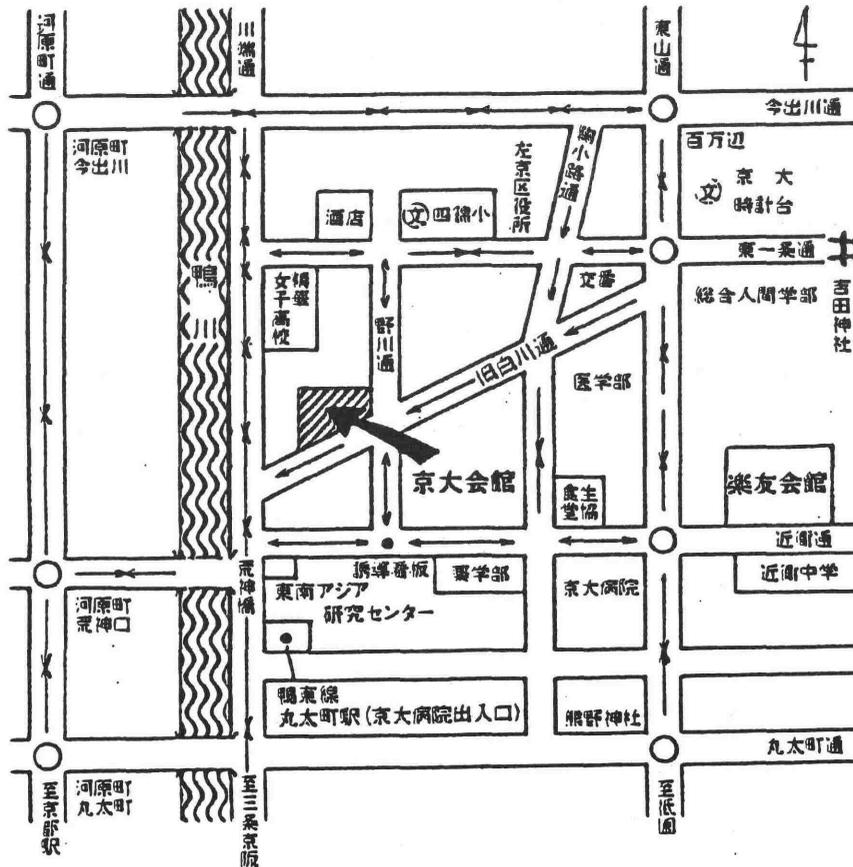
◇地下鉄とタクシー利用

京都駅より地下鉄国際会館行きにて丸太町下車, 北東出口からタクシー6分

◇京都市バス

京都駅 市バスのりば(A2)より206号バスに乗り, 東一条下車, 西へ徒歩5分
 四条京阪 (南座向かいバスのりば)より201, 31号バスに乗り, 東一条下車,
 西へ徒歩5分

◇京阪電車鴨東線丸太町駅下車北東へ徒歩5分



参加者への案内

参加受付 第1日 8月24日(木) 午前10.30より

講演会場 京大会館

参加費(懇親会費を含む) 一般 5,000円

学生 3,000円

(受付は2階です)

年会費 年会費を未納の方および新たに入会される方は、当日受付にてご納入下さい。

口演会場 A会場 210号室, B会場 101号室

演題発表方法

すべての発表(シンポジウムを含めて)は口演とポスターの両方で行っていただきます。

口演: 一般演題は討論を含めて10分~15分, シンポジウムは30分取ってあります。

進行は座長の指示に従って下さい。スライドプロジェクターは35mmスライド用を1台用意いたします。スライドは発表30分以上前までにスライド受付(2階)にお渡し下さい。

ポスター: ポスター会場は211, 212号室です。

よこ90cm x たて140cm(通常のものより小型)に入るようお願いします。

抄録集に示されている演題番号が貼られたボードにご展示ください。

(ポスターセッション時には飲み物などあり)

総会と昼食

補体研究会と生体防御学会の総会は2日目の昼食時に行います。この日の昼食は総会場内またはポスター会場内でも取れるようアレンジいたします。べんとうが必要な方は1日目午後1時までに参加受付にて引き替え券をお買い求め下さい。1日目に来られない方は、あらかじめ電話またはFAXにて申し込んで下さい(Tel 075-751-3845, FAX 075-751-4648, 京大・再生研 高沖悠子宛)

第38回補体シンポジウム・第12回日本生体防御学会 合同学術集会

日 程 表

8月24日(金)

8月25日(土)

				9.30
		合同セッション (A会場)		
10.30	受付開始 ポスター 展示開始			
		補体運営委員会 11.00-12.00		
		生体防御理事会 12.00-13.00	補体総会(A会場)	12.00
			生体防御総会(A会場)	12.30
13.00	開会の辞	開会の辞		13.00
13.10	生体防御 (A会場)	補体シンポ (B会場)	生体防御 (A会場)	13.10
			補体シンポ (B会場)	
15.10	コーヒーブレイク		コーヒーブレイク	15.10
15.30	シンポジウム(I) (A会場)		シンポジウム(II) (A会場)	15.30
18.00				17.00
18.30	懇親会 (B会場)			
19.30	ポスターセッション			

プログラム

第1日 8月24日(金)

生体防御 (A会場)

分子デザインによる生体防御のこころみ (13.10-13.45)

座長：小野寺節

- a-1 逆転写酵素活性阻害ペプチドの人工 cDNA による HIV-1 感染抵抗性の誘導
細川雅人, 岡田則子, 岡田秀親 (名市大・医・分子研・生体高分子)
- a-2 Rational Structure-Based Design of a Novel Inhibitor of
Carboxypeptidase R, a Regulator of Anaphylatoxins and Fibrinolysis
Eliada Lazoura^{1,2}, William Campbell², Noriko Okada¹, Hidechika
Okada¹ (¹Det. of Molecular Biology, Nagoya City Univ., Sch. Med.,
²Choju Medical Inst., Fukushima Hospital)
- a-3 ヒト染色体導入マウスを用いた抗 NefIgM モノクローナル抗体の作成とそ
の解析
河合正博¹, 藤井陽一², 岡田則子¹, 岡田秀親¹ (¹名市大・医・生体
高分子, ²名市大院・薬・生物薬品化学)

(総合討論)

プリオンの機能 (13.45-14.10)

座長：光山正雄

- a-4 プリオン蛋白欠損神経細胞株におけるコクサッキーウィルス B 群に対す
る高感受性
中村優子, 金子智美, 佐伯圭一, 松本芳嗣, 小野寺節 (東大院・農学
生命科学)
- a-5 Encephalomyocarditis virus B variant (EMCV-B)感染における野生型マウ
スとプリオン遺伝子ノックアウトマウスの脳組織内アポトーシスについ
ての検討
那須教子¹, 西村拓也¹, 広瀬裕子¹, 佐伯圭一¹, 松本芳嗣¹, 井上
敬一², 糸原重美², 小野寺節¹ (¹東大院・農学生命科学研究科・
²理研・脳科学総合研究センター)

(総合討論)

サイトカイン (14.10-15.10)

座長：吉開泰信

- a-6 結核感染防御における Th1 型サイトカイン(IFN- γ , IL-12, IL-18)の役割
金城雄樹¹, 川上和義¹, 屋良さとみ¹, 上江洲香織¹, 高口善信¹,
宮城一也¹, 竹田 潔², 審良静男², 岩倉洋一郎³, 渋谷和俊⁴, 直江
史郎⁴, 斎藤 厚(¹琉球大・第1内科, ²阪大・微研・癌抑制遺伝子,
³東大・医科研・ヒト疾患, ⁴東邦大・大橋病院・病理)
- a-7 BCG 生菌特有の IFN- γ 産生誘導因子の解析
河村伊久雄、角泰人、光山正雄 (京大院・医・微生物感染症学)
- a-8 抗原特異的メモリー CD8 T細胞の形成と維持における IL-15 の役割
矢島俊樹^{1,2}, 西村仁志¹, 桑野博行², 吉開泰信¹ (¹名大・医・病態研・
生体防御, ²群馬大・医・1外)
- a-9 IL-15 はマウス後天性免疫不全症候群の病態の進展を抑制する
梅村正幸¹, 西村仁志¹, 広瀬健二², 松口徹也¹, 牧野正彦³,
吉開泰信¹ (¹名大・医・病態研・生体防御, ²感染研・細菌, ³感染研・
ハンセン病センター)
- a-10 大腸菌死菌浮遊液の THP-1 細胞に対する TNF- α 活性誘導ならびに各種サ
イトカインの遺伝子発現の検討
瀧口邦雄^{1,2}, 稲川裕之³, 西沢孝志³, 本田晃子^{2,3}, 杉源一郎³
(¹マルホ・研究開発部, ²名古屋市立大医・生体高分子, ³徳島文理大・
健康科学)

(総合討論)

補体シンポ (B会場)

補体活性化と異常 (13.10-14.10)

座長：松尾清一，松下 操

- b-1 二つの Mannose binding lectin (MBL)分子型と MBL 遺伝子多型の関係
寺井 格, 小林邦彦¹, 松下昌直², 宮川 浩², 真船直樹³ (北海道医
療大・医療科学センター, ¹北大・小児科, ²帝京大・第4内科, ³北大・
病態医科学)
- b-2 ヒト MASP-1, MASP-2 および C1s 遺伝子のプロモーターの構造と機能
遠藤雄一, 高橋 実, 蔵屋幹夫, 松下 操, 藤田禎三 (福島県立医大・

医・二生化)

b-3 先天性ヒト補体 C3 欠損症における異常 C3 の解析

塚本 浩, 堀内孝彦, 永江祥之介¹, 姫路大輔, 小山貴子, 大塚淳司,
北村 肇², 北野悦子², 原田実根 (九大院・病態修復内科学,¹九大院
・皮膚科学,²大阪府立看護大・臨床検査学科)

b-4 博多抗原による補体レクチン経路活性化

松下 操, 蔵屋幹夫, 濱崎直孝¹, 辻村充志², 白木 洋², 藤田禎三
(福島県立医大・医・二生化,¹九大院・医. 臨床分子医学,²福岡県
赤十字血液センター)

b-5 特発性膜性腎症における factor H の検討

遠藤守人, 福家吉伸, 玉野まり子, 大澤 勲, 藤田宜是, 大井洋之
(日大・医・内科2)

(総合討論)

補体と病態 (14.10-15.10)

座長: 遠藤守人, 水野元夫

b-6 ヒト腎疾患における糸球体の C3a レセプターの分布についての検討

水野正司¹, 西川和裕², Philippe Gasque³, 松尾清一¹ (¹名大・医・
第3内科,²愛知医科大・第1内科,³ウエールズ大・生化学)

b-7 血栓形成性腎炎における thrombomodulin の抗炎症作用

丸山彰一, 池口 宏, 森田良樹, 藤田 豊, 松尾清一 (名大・医・
第3内科)

b-8 アレルギー性喘息病態における補体の関与

阿部正義¹, 清水直美², 早志友里¹, 坂田則行³, 赤津裕康⁴, 柴田
和彦², 桂木 猛¹, 岡田秀親⁵ (¹福岡大・医・薬理学,²病態機能系,
³第2病理学,⁴福祉村病院・長寿医学研,⁵名市大・分子医学研)

b-9 大腸癌患者便中 Decay-accelerating factor (DAF) と、潰瘍性大腸炎患者
便中 DAF のレクチン結合性の相違

岡咲博昭, 水野元夫, 那須淳一郎, 水野将克, 堀 伸一郎, 榎殿知穂,
平岡佐規子, 豊川達也, 武 進, 竹中龍太, 岡田裕之, 藤田禎三¹,
辻 孝夫 (岡山大院・医歯学総合研究科・消化器, 肝臓, 感染症内科学,
¹福島県立医大・生化学第二)

b-10 遺伝性血管神経性浮腫の一例

小西洋平, 加来倭磨, 筋浦立成, 松林 直 (福岡徳洲会病院・内科)

(総合討論)

シンポジウム I (A会場) (15.30-18.00)

Innate Immunity と Acquired Immunity をつなぐ

座長: 桂 義元

s-1 食細胞系を基盤として進む T, B リンパ球の分化

河本 宏 (京大・再生研・再生免疫)

s-2 Toll-like receptor と自然免疫

松口徹也 (名古屋大学・医・生体防御)

s-3 ナチュラルキラー細胞の多様性と機能

反町典子 (東京医科歯科大・院・感染分子制御学)

s-4 T細胞機能の多様性と調節

高山英二 (防衛医大・寄生虫学)

s-5 CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞による免疫自己寛容の維持機構及びその操作による自己免疫, 腫瘍免疫の誘導

坂口志文 (京大・再生研)

懇親会 (101号室) (18.00~)

ポスターセッション (211, 212号室) (19.30~)

第2日 8月25日(土)

合同セッション(A会場)(9.30-12.00)

合同-1 無脊椎動物の防御物質(9.30-10.15)

座長:中村三千男

a-11 カプトガニ抗菌ペプチドタキプレシンによるヘモシアニンのフェノール
オキシダーゼへの機能変換

尾崎 司¹, 永井 拓¹, 川畑俊一郎^{1,2,3} (1九大院・医・分子生命,
²九大院・理・生物科学, ³CREST)

a-12 原生動物タイヨウチュウのファゴサイトーシスを誘導する分泌性糖タン
パク gp40 の機能

洲崎敏伸¹, 坂口美亜子² (1神戸大・理・生物, ²ベルリン自由大)

a-13 ASABF型線虫抗菌ペプチドと富システイン型軟体動物抗菌ペプチドとの
特異な共通構造

張 紅, 加藤祐輔(生物研・動物生命・発生機構)

合同-2 脊椎動物における自然免疫I(10.15-11.00)

座長:野中 勝

b-11 コイ C5 の cDNA クローニング

加藤陽子, 中尾実樹, 無津呂淳一, 矢野友紀(九大院・農・水族生化学)

a-14 魚類のLBP/BPIホモログの遺伝子クローニングと構造解析

稲川裕之¹, 本田晃子¹, 西沢孝志¹, 乙竹 充², 中西照幸³, 横溝
祐一⁴, 杣源一郎¹ (1徳島文理大・健康科学 ²養殖研・病理 ³日本大・
生物資源・獣医 ⁴動物衛生試・免疫)

a-15 ニワトリ Toll-like receptor (TLR) の単離と機能解析

福井 理^{1,2}, 井上直和^{1,3}, 野村みどり¹, 松本美佐子¹, 瀬谷 司¹
(1大阪府立成人病センター研究所・免疫, ²奈良先端科学技術大学院
大学・バイオサイエンス研究科, ³阪大院・薬学研究科)

合同-3 脊椎動物における自然免疫Ⅱ (11.00-11.45)

座長：瀬谷 司

b-12 ラクトフェリン(Lf)によるウシ補体第二経路の活性化と黄色ブドウ球菌(SA)に対する除菌作用

貝 健三, 小峯 健一, 小峯 優美子, 黒石 智誠, 太田 實¹, 北村 肇², 熊谷 勝男 ((株)ティーセル研究所, ¹東北大・農学部, ²大阪府立看護大・医療短期大学部)

a-16 PU.1 as a Key Transcriptional Activator for the Expression of gp91^{phox} Gene in Human Myelogenous Cells

Rafiqul, M. I., Fan, C., Fujii, Y., and Nakamura, M. (Dept. Biochem. Inst. Trop. Med. Nagasaki Univ.)

b-13 Inflammatory defects caused by GPI-anchor deficiency in macrophages

Wouter Hazenbos, Irmgard Foster¹, Bjorn Clausen¹, Junji Takeda² and Taroh Kinoshita (Res. Inst. Microbial Dis., Osaka Univ., ¹Inst. Med. Microbiol., Immunol. and Hygiene, Technical Univ. Munich, and ²Dept. Env. Med., Osaka Univ. Medical School)

(総合討論 合同-1, -2, -3 司会：中村, 野中, 瀬谷)

生体防御 (A会場)

T細胞の生成 (13.10-13.30)

座長：松崎吾郎

a-17 マウス胎仔血液中におけるT前駆細胞の同定

伊川友活, 河本 宏, 桂 義元 (京大・再生研・再生免疫)

a-18 Adult thymus 中の初期分化段階におけるT前駆細胞が示す分化, 増殖能

陸 敏, 河本 宏, 伊川友活, 藤本真慈, 桂 義元 (京大・再生研・再生免疫)

感染とT・B細胞 (13.30-14.30)

座長：渡部直熙

a-19 マウス V δ 1⁺ γ δ T細胞による *Listeria monocytogenes* 感染初期の肝臓病巣形成の抑制

松崎吾郎, 原 博満, 岸原健二, 吉村昭彦 (九大・生医研・免疫制御)

a-20 真菌に対する Th1 誘導及び感染防御における V α 14⁺NK T 細胞の役割

川上和義¹, 金城雄樹¹, 屋良さとみ¹, 上江洲香織¹, 高口善信¹,
宮城一也¹, 中山俊憲², 谷口 克², 斎藤 厚¹ (¹琉球大・第1内科,
²千葉大・免疫発生)

a-21 腸管寄生線虫の感染防御における CD80 と CD86

渡辺直熙¹, 前田啓子² (¹慈恵医大・熱帯医学, ²順天大・アトピー研)

a-22 トランスジェニック (OVA23-3) マウスを用いた鼻粘膜における局所免疫
応答機構の解析

山田高也^{1,2}, 佐野啓介¹, 小笠原圭子¹, 鈴木達夫², 川内秀之¹
(¹島根医大・耳鼻科 ²北里研究所病院・研究部)

a-23 コイ IgM アイソフォームの好中球貪食におよぼす効果

下園真希¹, 小玉 仁¹, 森友忠昭¹, 中尾実樹², 矢野友紀², 苫名 充³,
井上裕基¹, 中西照幸¹ (¹日大獣医, ²九大院生資環, ³日大応用生物)

(総合討論)

免疫反応と組織障害 (14.30-15.10)

座長：岡田秀親

a-24 呼吸器ウイルス感染病態における NO の役割

岡本真一郎^{1,2}, 赤池孝章¹, 吉武 淳¹, 菅 守隆², 前田 浩¹
(¹熊本大・医・微生物, ²同・第一内科)

a-25 NO およびニトロソチオールの抗アポトーシス作用を介する感染防御

田村文雄^{1,2}, 赤池孝章¹, 菅 守隆¹, 前田 浩¹ (¹熊本大・医・微生物,
²一内)

a-26 ラット C5a 受容体の組織分布解析

赤津裕康^{1,2}, 阿部正義⁴, 三輪隆史¹, 立山 尚³, 前田誠司¹, 岡田
則子², 小島清秀¹, 山本孝之¹, 岡田秀親² (¹福祉村病院・長寿研,
²名市大・医・生体高分子, ³第二病理, ⁴福岡大・医・薬理)

(総合討論)

補体シンポ（B会場）

補体成分のクローニングと欠損（13.10-14.10）

座長：井上徳光，中尾実樹

b-14 カタユウレイボヤ補体系遺伝子の網羅的解析

吉崎 史子，野中 勝（東大院・理学系・生物科学）

b-15 *Xenopus* MASP-3 の cDNA クローニングと遺伝子構造の解析

柿沼雄二，遠藤雄一，高橋 実，松下 操，藤田禎三（福島県立医大・医・第二生化学）

b-16 Membrane cofactor protein (MCP, CD46)欠損マウスの解析

井上直和^{1,2}，野村みどり¹，中西友子³，伊川正人³，瀬谷 司¹，岡部勝³（¹大阪府立成人病センター研究所・免疫，²阪大院・薬・病因病態，³阪大・遺伝子情報実験センター）

b-17 GPI アンカー欠損細胞は免疫担当細胞の攻撃に抵抗性である — 発作性夜間血色素尿症モデルマウスを使って

村上良子，小阪 博¹，竹田潤二²，木下タロウ（阪大・微研・免疫不全，¹阪大・医・皮膚科，²阪大・医・修士環境医学）

b-18 PNH クローンの拡大に関わる候補遺伝子の同定

泉井朋久¹，桑山真輝^{1,2}，西村純一^{1,2}，待井隆志²，金倉 譲²，木下タロウ¹，井上徳光¹（¹阪大・微研・免疫不全，²阪大・医・血液腫瘍内科）

（総合討論）

補体の動態と産生（14.10-15.10）

座長：北村 肇，寺井 格

b-19 C3a および C5a に対する Carboxypeptidase N と Carboxypeptidase R の反応性

William Campbell^{1,2}，岡田則子¹，Eliada Lazoura^{1,2}，岡田秀親¹

（¹名市大・医・分子医学研，²福祉村病院・長寿医学研）

b-20 アニオン性高分子電解質をグラフトした表面の factor D 吸着体としての可能性

村上能庸，北野悦子¹，北村 肇¹，岩田博夫（京大・再生研，¹大阪府立看護大・医療技術短大部）

b-21 血清補体価(CH50)は補体第2経路(AP)活性化を反映するか？

小林恵美, 北野悦子, 村上能庸¹, 岩田博夫¹, 北村 肇 (大阪府立看護大学・医療技術短大部, ¹京大・再生研)

b-22 正常ヒト肝細胞によるD因子産生(第2報)

北野悦子, 福森泰雄¹, 北村 肇 (大阪府立看護大学・医療技術短大部, ¹大阪府赤十字血液センター)

b-23 Glioma cell line, T98G細胞でのレクチン経路成分MASP1, -3および博多抗原の発現・産生

藏屋幹夫, 松下 操, 遠藤雄一, 藤田禎三 (福島県立医大・医・第二生化学)

(総合討論)

シンポジウムⅡ (A会場) (15.30-17.00)

免疫系の多様性——無脊椎動物から脊椎動物まで

座長：藤田禎三

s-6 カブトガニにおける異物認識の分子基盤

川畑俊一郎 (九大・院・理学研究院, 生物科学)

s-7 ショウジョウバエの自然免疫系を制御するパターン認識分子

倉田祥一郎 (東北大・院・薬学研究科)

s-8 ゲノム科学の視点からみた免疫系

笠原正典 (総合研究大学院大学・先導研・生命体科学)

一般口演抄録

a: 生体防御

b: 補体シンポ

逆転写酵素活性阻害ペプチドの人工 cDNA による HIV-1 感染抵抗性の誘導

◎細川雅人 岡田則子 岡田秀親
名市大・医・分子研・生体高分子

[目的]

新しいコンピュータープログラムである MakeAnti によってデザインされたペプチドを合成し検討した結果、HIV-1 の reverse transcriptase 反応を *in vitro* で阻害する anti-peptide が 3 種類 (TLMA2993, PSTW1594, ESLA2340) 明らかになった (Lawrence, K. et al. Under submission)。そのうち最も阻害活性の強い TLMA2993 を、人工的に作成した cDNA によって細胞に導入し発現させることにより、HIV-1 の感染拡大が阻止されるかどうかを検討した。

[方法]

HIV-1 の reverse transcriptase の反応を阻害する anti-peptide である TLMA2993 を発現することができるベクターを shot-gun ligation method を用いて構築し、単球系細胞株 U937 細胞へ electroporation 法により導入した。TLMA2993 を高発現するクローンを選び HIV IIIB 感染 U937 細胞との co-cultivation を行った。HIV IIIB 感染率は p24 発現を指標として、FACS Calibur を用いて測定した。また、HIV IIIB 感染細胞の培養上清を TLMA2993 発現 U937 細胞に添加して培養を行い、細胞内に発現した TLMA2993 が HIV-1 の感染拡大を阻害しているかどうかを HIV IIIB の genomic PCR により確認した。細胞内に発現している TLMA2993 の濃度は competitive ELISA によって測定した。

[結果と考察]

Co-cultivation experiment を行った結果、U937/TLMA2993 : U937 IIIB=200 : 1 の混合培養系においては、40 日目での感染率は 10% 台であったが、ベクターのみを導入した U937 では 90% 以上に達していた。また、500 : 1 の混合培養系においても、48 日目での U937/TLMA2993 cell の感染率は約 16% であったが、ベクターのみの U937 では 95% を越えていた。この結果より、TLMA2993 発現細胞においては、HIV-1 の感染拡大が阻害されていることが判明した。

また、HIV IIIB のウイルス上清と U937/TLMA2993 cell との混合培養後、genomic DNA

を定法により回収し、HIV-1 特異的プライマーを用いて PCR を行ったところ、TLMA2993 を発現している U937 細胞では TLMA2993 によって逆転写が阻害され、染色体上への HIV-1 ゲノムの integration が抑制されていることが明らかとなった。

Competitive ELISA による細胞内 TLMA2993 ペプチド濃度の測定によって、上記の co-cultivation experiment 及び、genomic PCR とともに、TLMA2993 ペプチドの濃度依存的に reverse transcriptase の反応阻害が起こっていることが確認された。

[結論]

MakeAnti によりデザインされた anti-peptide を cDNA 導入により細胞内発現させることにより、より効果的に抗 HIV 活性を発現しうることが判明した。

[引用文献]

- 1) Grundstrom, T. et al. Oligonucleotide directed mutagenesis by microscale "shot-gun" gene synthesis. *Nucleic Acid Res.* 13, 3305-3316 (1985).
- 2) Safrany, G. et al. Structural determinant of the species-specific transcription of the mouse rRNA gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 9, 349-353 (1989).
- 3) Okada, H., Wu, X. & Okada, N. Complement mediated cytolysis and azidothymidine are synergistic in HIV-1 suppression. *International Immunol.* 10, 91-95 (1998).
- 4) Wu, X. et al. Complement-mediated anti HIV-1 effect induced by human IgM monoclonal antibody against ganglioside GM2. *J. Immunol.* 162, 533-539 (1999).
- 5) Chun, T-W. et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature.* 387, 183-188 (1997).

Rational Structure-Based Design of a Novel Inhibitor of Carboxypeptidase R, a Regulator of Anaphylatoxins and Fibrinolysis.

Eliada Lazoura^{1,2}, William Campbell², Noriko Okada¹ and Hidechika Okada¹

1. Department of Molecular Biology, Nagoya City University, School of Medicine, Nagoya 467-8601, JAPAN.
2. Choju Medical Institute, Fukushima Hospital, Toyohashi, 441-8124, JAPAN.

AIM:

A novel carboxypeptidase R (CPR) inhibitor, related to potato carboxypeptidase inhibitor (PCI), has been designed using rational structure-based strategies. CPR – also known as plasma carboxypeptidase B (CPB), carboxypeptidase U (CPU) or activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa) – plays a crucial role in the regulation of fibrinolysis in addition to acting as an inactivator of inflammatory mediators, such as anaphylatoxins of complement, by preferentially removing C-terminal arginine (R) residues. During fibrinolysis, CPR removes C-terminal lysine (K) residues from partially degraded fibrin clots, thereby preventing the binding of plasminogen and subsequent degradation of the blood clot. Here we report a small 9-mer peptide, designated CPI-2KR, which can effectively reduce the anti-fibrinolytic effect of CPR. This peptide represents a template molecule for the design of a smaller organic compound for use in thrombolytic therapy.

MATERIALS AND METHODS:

Peptide Synthesis:

Amidated peptides were synthesised using standard F-moc chemistry on an AMS 422 Multiple Peptide Synthesiser (ABIMED, Langenfeld, Germany). Purified peptides were verified using electrospray mass spectroscopy on a Kompact Maldi II (Kratos Analytical, Shimadzu, Japan).

Nitrocellulose-bound overlapping peptides (10-mers) derived from PCI were prepared using an Auto-Spot Robot ASP 222 peptide synthesiser (ABIMED) on Whatman 50 membranes.

Hippuryl-L-Arginine Hydrolysis Assay:

The inhibitory activity of the CPR inhibitors (PCI as a positive control) was determined against purified CPR using hippuryl-L-arginine as a substrate. proCPR was activated using a thrombin/thrombomodulin/calcium mixture. After 10 min incubation at room temperature, the activation was stopped by addition of PPACK. Peptide or PCI were incubated with CPR at 37 °C for 15 min. To stop the reaction, GEMSA was added. The release of hippuric acid was extracted with ethyl acetate, evaporated, re-dissolved in distilled water and the OD at 228 nm was measured using RP-HPLC.

Fibrinolysis Assay:

Human plasma was obtained by centrifugation of citrated blood at 3000 × g for 15 min at room temperature. In a 96-well microtitre plate, a thrombin/calcium mixture was added immediately followed by thrombomodulin (TM). Subsequently, peptide or PCI were added. After the addition of a t-PA/plasma mixture, the plate was immediately read at 420 nm every 5 min for 2 h on a SpectraMAX 250 Microplate spectrophotometer. Lysis time was defined as the time required for the absorbance to reach half the difference between the plateau reached after clotting and baseline achieved at clot lysis.

RESULTS AND DISCUSSION:

Crystal structure studies have shown that PCI binds to carboxypeptidase A (CPA) through its C-terminus. Our studies, however, have shown that peptide fragments of PCI corresponding to its C-terminal region do not inhibit CPR. Since the function of CPR is to remove C-terminal K and R residues from target peptides, we investigated the possibility that PCI inhibits CPR by competitively binding via these residues. Close inspection of the X-ray structure of PCI complexed to CPA revealed that the two K and single R residues of the former are orientated in the same direction.

In view of this, two peptide fragments mimicking the PCI region believed to be responsible for the observed activity were synthesised. The first peptide (PCI-2K) contained the two K residues and the second peptide (PCI-R) contained the R residue. These peptides represent two regions of PCI maintained in close spatial proximity by three disulfide bridges. As a starting point, peptides PCI-2K and PCI-R, both containing a single cysteine residue, were oxidised to form the heterodimer PCI-2K-R. In contrast to the monomeric peptides, for which no activity was observed, the heterodimer, PCI-2K-R, proved to be a competitive inhibitor of PCI. Although PCI-2K-R could not reverse the TM-induced retardation of tissue t-PA-induced fibrinolysis, the competitive inhibition observed indicates that the region responsible for inhibitory activity of PCI against CPR had been identified. To support these results, proCPR was allowed to react with 10-mer PCI peptide fragments synthesised on a nitrocellulose membrane. Following overnight incubation at 4 °C and subsequent washing of the membranes, bound proCPR was detected using an FITC-labeled anti-proCPR mAb (10G1-FITC). The results showed that proCPR binding is strongest with peptides containing two K residues and also with peptides containing an R residue at their N-terminus.

In view of the promising results obtained for the peptide PCI-2K-R, the crystal structure of PCI was more closely examined. In particular, the spatial C_α-C_α and C-N distances between the K and R residues were determined. Subsequently, a novel linear peptide was designed based on the data obtained from PCI (CPI-2KR). Peptide CPI-2KR was tested for its ability to reverse the TM-induced retardation of t-PA-induced fibrinolysis. Remarkably, this short linear peptide showed dose-responsive CPR inhibition in plasma clot lysis, similar to that previously observed for PCI.

CONCLUSION:

Peptide CPI-2KR represents a novel CPR inhibitor for use in thrombolytic therapy. Our ultimate aim is to design a low molecular weight molecule based on CPI-2KR, which is resistant to degradation thus allowing for oral administration. Ongoing studies, particularly in animal models, will establish the benefits of CPI-2KR for use in thrombolytic therapy alone or in combination with PCI and/or t-PA.

ヒト染色体導入マウスを用いた抗 Nef IgM モノクローナル抗体の作成とその解析

◎河合正博¹ 藤井陽一² 岡田則子¹ 岡田秀親¹¹名市大・医・生体高分子、²名市大院・薬・生物薬品化学

〔目的〕

ヒト染色体導入マウスにリコンビナント Nef 蛋白を免疫し、HIV-1 感染細胞膜上に発現している Nef 蛋白を認識するヒト型抗体を作成し、それらの反応動態を解析する。また、この抗体を用いて、HIV-1 感染細胞や潜伏感染細胞における Nef の発現動態を解析し、HIV-1 感染時の、Nef 発現の意義を究明する。

〔材料及び方法〕

キリンビールより供与を受けた、ヒト 2 番及び 1 4 番染色体導入マウスに、リコンビナント Nef $25\mu\text{g}$ を、7 日毎に 3 回腹腔内に免疫した。免疫マウスの脾臓細胞をミエローマ細胞 (P3U1) とフュージョンさせ、ハイブリドマを作成し、HIV-1 感染細胞 (MOLT4/III B) による FACS 解析と、Nef を抗原とした ELISA でスクリーニングした後、クローニングを行った。抗体産生細胞クローンを、ヌードマウスに腹腔内投与し腹水を回収し、高濃度の抗体を得た。Nef トランスフェクタント細胞株である Nef-U937 との反応性を確認した。潜伏感染から活性化され、HIV-1 を産生するようになる過程での Nef の発現動態を、HIV-1 潜伏感染細胞 OM10.1 (鹿児島大・医・馬場先生より供与) を用いて解析した。解析には FACS を用い、二次抗体にはこの抗体の特異性である λ 鎖を

利用する目的で、FITC ラベル抗マウス λ 鎖抗体を用いた。また、OM10.1 を 10ng/ml TNF- α 刺激を加え、経時的に細胞膜上の Nef の発現変化を観察した。

〔結果〕

得られた抗 Nef 抗体産生細胞のクローニングより、アフィニティが高く、ヒト型の μ 鎖、マウス型の λ 鎖を持つ抗体産生細胞株である 3H3E と 3B4B を得た。これらの抗体は MOLT4/III B と高い反応性を示した。Nef-U937 を 7 2 時間 $10\mu\text{g/ml}$ カドミウム処理により誘導発現される Nef と結合性を示した。また潜伏感染細胞 OM10.1 においても Nef 発現が検出された。さらに、TNF- α 刺激後 48 時間では Nef の発現量の増大は観察されなかった。

〔結論・考察〕

HIV-1 感染細胞膜上に発現する Nef を認識する、ヒト型モノクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて、Nef の細胞発現動態を解析した結果、 0.5β (抗 gp-120 抗体) が反応しない潜伏感染細胞 OM10.1 において反応性が確認された。Nef の潜伏感染における役割は未だ不明であるが、今後さらに検討することが、治療につながる事が考えられる。

プリオン蛋白欠損神経細胞株におけるコクサッキーウイルス B 群に対する高感受性

中村優子、金子智美、佐伯圭一、松本芳嗣、小野寺節

(東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻応用免疫学教室)

【目的】ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するコクサッキーウイルス B 群(CVB) は、髄膜脳炎¹⁾、急性膀胱炎²⁾、乳児期、幼児期における糖尿病^{3, 4)}、あるいは心筋炎^{5, 6)}の主な原因ウイルスであるとされる。CVB の分離同定において、初代サル腎細胞における CVB の増殖は良いとされてきたが、その使用は一般的でなく、また他の細胞株での増殖・分離が困難であることから分離培養、同定のためには乳飲みマウスへの接種が最良とされる⁷⁾。しかし、その効率、コストを考慮すれば、CVB 分離培養、同定に適した高感受性の細胞株の樹立が必須である。そこで本研究では、当研究室においてプリオンノックアウトマウス胎児海馬より分離、不死化された細胞株に着目した。我々はこの細胞株を用い、正常型プリオンの神経細胞におけるアポトーシスへの関与を示唆する結果を既に発表しているが⁸⁾、CVB は感染時にアポトーシスを伴うことが示唆されており、本細胞株の CVB に対する感受性の検討を行うべく、以下の実験を進めた。

【材料および方法】ウイルスは CVB1, 2, 3, 4, 5, 6 を用いた。細胞株には、プリオン蛋白欠損細胞株 HpL3-4 および CVB 分離、同定に汎用されるヒト HEp-2, HeLa 細胞を用いた。まず、各細胞株における CVB1-6 の TCID50 測定を行った。また、各 CVB 接種後経時的に観察を行い、細胞変性効果(CPE) を呈するまでの時間を比較すると同時に、CVB 感染各細胞株の細胞および上清を回収、各サンプルのウィルス力価の比較検討を行った。さらに、CVB 感染 HpL3-4 細胞のエチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ染色による形態学的観察、抽出 DNA の電気泳動を用いた生化学的解析による DNA 断片化の検出を試みた。

【結果】HpL3-4 での CVB1, 3, 4, 5 感染による TCID50 値は、HEp-2, HeLa 細胞に比し、有意に高い値を示した。また、これら HpL3-4 における CPE は HEp-2, HeLa 細胞より早期に表れ、さらに明瞭なブラック形成も確認された。CVB 感染細胞および上清中のウィルス力価は、HEp-2, HeLa 細胞では感染後 96 時間以降の回収サンプルにおいてピーク値を示したのに対し、HpL3-4 では

感染後 48 時間でピーク値に達し、その価は HEp-2, HeLa 細胞の約 10 倍を示した。CVB 感染 HpL3-4 細胞の形態学的観察において、凝集、断片化した核が観察された。さらに、これらの抽出 DNA は電気泳動像において典型的なラダーを示した。

【考察および結論】以上の結果より、本研究で検討したプリオン蛋白欠損細胞株 HpL3-4 は、CVB に対し高 TCID50 値を示し、より迅速な CPE の判別が可能ながことが明らかとなった。さらに、HpL3-4 の CVB 感染による細胞死にアポトーシスが関与していることが示唆された。本研究は HpL3-4 が CVB 分離に非常に有用な細胞株であることを示唆し、今後、検体からの新生ウィルス分離へ応用が期待できる。また、CVB 増殖およびその阻害とプリオン蛋白質との関与の有無も非常に興味深い点であり、ひきつづき解析を行っている。

【引用文献】1) J. L. Melnick, in *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996), vol. 1, pp. 655-712.

2) C. W. Imrie, J. C. Ferguson, R. G. Sommerville, *Gut* 18, 53 (1977)

3) J. W. Yoon, M. Austin, T. Onodera, A. L. Notkins, *N. Engl. J. Med.* 300, 1173 (1979)

4) G. B. Clements, D. N. Galbraith, K. W. Taylor, *Lancet* 346, 221 (1995)

5) N. R. Grist and D. Reid, in *Viral Infections of the Heart*, J. Banatvala, Ed. (Arnold, London, 1993), pp. 23-31

6) M. C. Savoia and M. N. Oxman, in *Principles and Practice of Infectious Diseases*, G. M. Mandell, J. E. Bennet, R. Dolin, Eds. (Churchill Livingstone, New York, 1995), vol. 1, pp. 799-813

7) G. Douglas, in *Coparative Diagnosis of Viral Diseases*, E. Kurstak, C. Kurstak, Eds. (Academic press, New York, 1977), pp. 344-383

8) C. Kuwahara, T. Onodera *et al*, *Nature* 6741, 225 (1999)

Encephalomyocarditis virus B variant (EMCV-B)感染における野生型マウスとプリオン遺伝子ノックアウトマウスの
脳組織内アポトーシスについての検討

那須教子¹、西村拓也¹、広瀬裕子¹、佐伯圭一¹、松本芳嗣¹、井上敬一²、糸原重美²、小野寺節¹、¹東京大学大学院農
学生命科学研究科応用免疫学教室、²理化学研究所脳科学総合研究センター行動遺伝学技術開発チーム

(背景と目的) 牛伝達性海綿状脳症や羊におけるスクレイピー、また現在話題の医原性クロイツフェルト・ヤコブ病、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病に代表されるプリオン病は致死性の中樞神経変性疾患である。プリオン病はその発症が伝達性、散発的、或いは遺伝的であり、また動物、人間の両方で発症することから、その伝達機構の解明や治療法の開発が急がれている。プリオン病の原因蛋白質とされる異常型プリオン蛋白質は正常型プリオン蛋白質が構造的に変換したものであり、感染個体においては脳内に異常型プリオン蛋白質の蓄積が見られる。正常型プリオン蛋白質は細胞膜表面に結合する糖蛋白質であり、主に神経細胞で高い発現が見られ、またグリア細胞においてもその発現が確認されている。プリオン病は神経変性、アポトーシスによる神経細胞死、そしてグリオシスを特徴としているが、未だこれらの病変が異常型プリオン蛋白質の神経毒性によるものなのか、正常型プリオン蛋白質の欠損によるものなのか、それとも他の機構によるものなのかは明らかにされていない。加えて、正常型プリオン蛋白質が生体内で担う機能についても未だ十分には解明されていないが、これまでに、グリア細胞の増殖やアポトーシスによる神経細胞死の抑制における正常型プリオン蛋白質の役割を示す様々な事実が *in vitro* において提示されている。(1, 2, 3)。本実験では野生型マウス(C57BL/6J、*Prnp*^{+/+})とプリオン遺伝子ノックアウトマウス(*Prnp*^{-/-})に脳心筋炎ウイルス B 株を感染させ、上記の *in vitro* (マウス脳) において示されたプリオン蛋白質の機能について *in vivo* にて検討した。脳心筋炎ウイルスは *in vitro* において初代培養の線維芽細胞にアポトーシスを誘導することが知られており、またその名の通り、感染したマウスに脳炎を引き起こすことが知られている(4, 5, 6)。

(方法) プリオン遺伝子(*Prnp*)の heterogus(*Prnp*^{+/+})な個体同士を交配させ、同腹の *Prnp*^{+/+}、*Prnp*^{-/-} 個体を得、6 週齢、15 週齢個体に対し、脳心筋炎ウイルス B 株の脳内接種による感染実験を行った。感染後、脳におけるウイルス力価の測定、ヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織学的観察を行った。さらに感染 7 日目の 15 週齢個体の脳組織切片を用いて、TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出を行った。

(結果) 脳内のウイルス力価については 6 週齢、15 週齢のどちらにおいても *Prnp*^{+/+} と *Prnp*^{-/-} の群間に差は認められなかった。しかし病理組織学的検索において 600 pfu の脳心筋炎ウイルス B 株を感染させた 15 週齢の *Prnp*^{+/+} の脳の海馬領域周辺では *Prnp*^{-/-} に比べ、重度の細胞浸潤やグリアの増殖を伴う、より激しい炎症が観察された。また TUNEL 法により、*Prnp*^{-/-} の脳において、海馬の CA1 領域の錐体細胞及び大脳皮質の錐体細胞に多数の TUNEL 陽性細胞が検出され、アポトーシス細胞の増加が考えられた。*Prnp*^{+/+} の脳においても浸潤細胞や神経細胞にアポトーシスが認められたが、その数は *Prnp*^{-/-} に比べ極めて少数であり、また海馬の CA1 領域の錐体細胞においては損傷が観察されるにも関わらず、TUNEL 陽性細胞は検出されなかった。

(考察) 以上の結果から *in vivo* においても正常型プリオン蛋白質がグリアの増殖を伴う炎症反応、そして神経細胞のアポトーシスに関与していることが示唆された。

(引用文献)

1. Brown, D.-R. et al., 1996. A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of Microglia but not astrocytes in culture. *Glia*, 18:59-67.
2. Brown, D.-R. et al., 1996. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, 380:345-347.
3. Kuwahara, C., et al., 1999. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*, 400:225-226.
4. Schwarz, E.-M., et al., 1998. NF-kb-mediated inhibition of apoptosis is required for encephalomyocarditis virus virulence: a mechanism of resistance in p50 knockout mice. *J. virol.*, 72(7):5654-5660.
5. Tanaka, N., et al., 1998. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Gene to cell*, 3:29-37.
6. Shafi, R., et al., 1993. Pathogenesis of the B Variant of Encephalomyocarditis Virus. *J. Med. Virol.*, 40:193-199.

結核感染防御における Th1 型サイトカイン (IFN- γ , IL-12, IL-18) の役割

◎金城雄樹¹, 川上和義¹, 屋良さとみ¹, 上江洲香織¹, 高口善信¹, 宮城一也¹,

竹田 潔², 審良静男², 岩倉洋一郎³, 渋谷和俊⁴, 直江史郎⁴, 斎藤 厚¹,

(¹琉球大第一内科, ²阪大微研・癌抑制遺伝子, ³東大医科研・ヒト疾患, ⁴東邦大大橋病院病理)

[目的]

結核感染防御において IFN- γ は重要なサイトカインである。IFN- γ 誘導性サイトカインである IL-12 及び IL-18 の結核感染防御における役割も、それぞれの遺伝子欠損マウス (KO マウス) を用いた報告がある。しかし結核感染防御におけるこれらのサイトカインの役割は未だ充分には解明されていない。特に IL-12KO マウス及び IL-18KO マウスを同時に用いてこれらサイトカインの役割を比較した報告はない。今回我々は IL-12KO マウス, IL-18KO マウス, IL-12 及び IL-18 遺伝子を共に欠損した (DKO) マウスを用いて結核感染防御能を比較した。また DKO マウス及び IFN- γ 遺伝子欠損 (GKO) マウスを用いて結核感染防御能を比較した。

[方法] 8~14 週齢雄の IL-12KO, IL-18KO, DKO マウスおよび野生型として C57Bl/6 マウスを用いた。これらのマウスに経静脈的にヒト型結核菌 H37Rv 1×10^6 を接種し、生存率を比較した。また感染 2 週後及び 5 週後の臓器内菌数及び感染 1, 2, 5 週後の血清中のサイトカインの産生量を ELISA にて測定した。また IL-18KO マウスに 0.02, 0.1 または 0.5 μ g の IL-12 を感染後 7 日間連日投与し、2 週後に野生型マウスと血清 IFN- γ の産生量を比較した。

次に 8~14 週齢雄の DKO マウス, GKO マウス及び野生型として C57Bl/6 マウスを用いた。これらのマウスに経静脈的にヒト型結核菌 H37Rv 1×10^6 を接種し、生存率を比較した。また感染 4 週後の臓器内菌数及び血清中のサイトカインの産生量を ELISA にて測定した。また感染 4 週後に肺, 肝臓及び脾臓を摘出し、組織切片を作成し hematoxylin-eosin 染色及び Ziehl-Neelsen 染色を行い、病理組織学的検討を行った。

[結果と考察]

IL-12KO マウス, IL-18KO マウス, DKO マウス及び野生型マウスの生存率の比較では, DKO マウスで IL-12KO マウスより有意に短かった。感染後 3 カ月の時点で IL-18KO 及び野生型マウスの死亡は認められなかった。感染 5 週後の臓器内菌数は DKO, IL-12KO, IL-18 KO, 野生型の順に多く認められた。感染 1, 2, 5 週後の血清 IFN- γ の値は IL-18KO で野生型と比較して有意に低かった。また DKO, IL-12KO マウス共に IFN- γ は検出されなかった。血清 IL-12 の値も IL-18KO で野生型と比較して有意に低かったため, 次に IL-18KO マウスに IL-12 を投与し, 野生型マウスと血清 IFN- γ の産生量を比較した。IL-18KO マウスに過剰量の IL-12 を投与した場合でも IFN- γ の産生は, 野生型マウスに比べ有意に低かった。以上の結果より IL-12 のみならず, IL-18 も結核感染防御に寄与していることが示唆された。

次に GKO マウスと DKO マウスでの生存率の比較では GKO マウスでは生存日数が DKO マウスと比較して有意に短く, 臓器内生菌数がより多く認められた。血清中の IFN- γ は GKO, DKO マウス共に検出されなかった。DKO マウスに抗 IFN- γ 抗体を投与して GKO マウスと生存日数を比較したが, DKO マウスに抗 IFN- γ 抗体を投与した場合でも特に影響はみられなかった。感染 4 週後の病理組織像では GKO マウスで中心部壊死を伴う肉芽腫性病変を多数認め, 多数の結核菌が観察された。DKO マウスでは GKO マウスと比べて肉芽腫性病変の数も少なく, 結核菌の数も GKO マウスに比べて少なかった。DKO マウスと GKO マウスでは, 結核感染防御能に明らかな違いが認められた。現在その原因として抗 TNF- α 抗体の影響について検討しているところである。

BCG 生菌特有の IFN- γ 産生誘導因子の解析

◎河村伊久雄、角泰人、光山正雄

京大院・医・微生物感染症学

〔目的〕

結核菌、BCG あるいはリステリアなどに代表される細胞内寄生菌に対する感染防御は、細胞性免疫が主体となる。その中心的な役割を果たす Th1 型 T 細胞はこれら細胞内寄生菌の生菌感染によって誘導され、その後の攻撃感染に対して強い再感染抵抗性を発現する。一方、これらの死菌でマウスを免疫した場合には、生菌感染で誘導される強い感染防御は認められない。しかし、感染抵抗性 T 細胞を死菌で刺激すると IFN- γ 産生が誘導されることから、死菌にも感染防御の発現に重要な抗原は存在するが、死菌免疫では感染抵抗性 T 細胞の分化を誘導することができないものと考えられる。これらの結果から、我々は死菌には認められない Th1 型感染抵抗性 T 細胞の分化を誘導する因子が生菌に存在すると考えている。一方、我々はリステリアあるいは BCG 生菌感染後早期に誘導される IFN- γ が、Th1 型感染抵抗性 T 細胞の分化に重要であることを明らかにしている。また、この IFN- γ 産生は *in vitro* でマウス正常脾細胞あるいは腹腔滲出細胞を刺激した場合にも認められることを示している。そこで本研究では、BCG 生菌および死菌、あるいはそれらの菌体 lysate や培養上清でマウス腹腔細胞を刺激し、感染抵抗性 T 細胞の分化に重要な Th1 型サイトカイン産生を誘導する BCG 生菌特有の因子を特定することを目的として解析を行った。

〔方法〕

***M. bovis* BCG の調製**：*M. bovis* BCG pasteur 株を Middlebrook 7H9 培地で 3 週間培養し、凝集塊を取り除いた後、-80°C で保存した。また、BCG を 70°C、30 分あるいは 1%ホルマリンで一晩処理して死菌懸濁液を調製した。**BCG 菌体 lysate および培養上清の調製**：BCG 生菌あるいは死菌懸濁液に 0.1mm zirconia/silica beads を加え、mini bead-beater で処理して菌体 lysate を作製した。Lysate は 20k x g で 30 分遠心し、可溶性画分と不溶性画分に画分した。Middlebrook 7H9 培地で 3-4 週間培養した BCG を Sauton 培地で洗浄後、同培地で 1 日培養してその上清を回収した。これを限外濾過法により濃縮後、BCG 培養上清として実験に用いた。**サイトカイン産生**：3% thyoglycollate を C3H/HeN マウスの腹腔内注射し、3 日後に腹腔滲出細胞(PEC)を回収した。BCG 由来の各種サンプルで PEC (10^6) を刺激し、産生されたサイトカイン

量を ELISA 法で測定した。また、各種サイトカイン (IL-1 α , IL-1 β , IL-12 p70, IL-18, TNF- α) に対する抗体、抗 CD14 抗体あるいは LPS のアンタゴニストである E5531 を培養系に加え、それらの IFN- γ 産生への影響を調べた。

〔結果と考察〕

BCG 生菌および死菌刺激後の IFN- γ 産生：PEC を BCG 生菌および死菌刺激し、経時的に IFN- γ 産生量を測定した。その結果、BCG 生菌で刺激した場合には培養 1 日後に明らかな IFN- γ 産生が認められ、その産生は経時的に増加した。一方、死菌刺激の場合、培養 1 日後の IFN- γ 産生は、コントロールレベルであり、その産生量は経時的に増加する傾向にあったが、生菌刺激の場合に比較して明らかに弱いものであった。BCG 生菌刺激で誘導される IFN- γ 産生は、IL-1 α 、IL-1 β および TNF- α に対する抗体による影響を受けなかったが、抗 IL-12 p70 抗体および抗 IL-18 抗体により抑制された。また、腹腔マクロファージからの IL-12 p40 および IL-18 の産生は、IFN- γ 産生の場合と同様に BCG 死菌刺激に比較して生菌刺激で明らかに高かった。これらの結果から、BCG 生菌刺激による IFN- γ 産生は、BCG 生菌がマクロファージを刺激し、その IL-12 および IL-18 産生を誘導したためであると考えられた。また、この IFN- γ 産生は抗 CD14 抗体や E5531 で抑制されなかったことから、CD14/Toll-like receptor 4 を介するシグナル伝達系の関与は低い可能性が示唆された。**BCG 生菌由来サイトカイン産生誘導因子の解析**：BCG 生菌および死菌 lysate を作製し、それらの IL-12 p40 産生誘導活性を調べた。BCG 生菌 lysate には強い IL-12 p40 誘導活性が認められた。一方、死菌刺激では IL-12 p40 は誘導されなかったが、その lysate には誘導活性があることがわかった。また、この活性は主に BCG lysate の不溶性画分に存在することが示された。さらに、BCG 生菌の培養上清には IL-12 p40 産生誘導活性が認められたが、同様に調製した死菌の培養上清にはその活性は認められなかった。これらの結果から、BCG 生菌由来の分泌性因子が Th1 型サイトカイン産生および感染抵抗性 T 細胞の分化に重要で、死菌刺激でサイトカイン産生が誘導されないのは、死菌にはこの因子を分泌する能力が無いためであると考えられた。この BCG 生菌特有の因子は 95°C、15 分の加熱処理に耐性を示すことがわかっており、現在さらに解析を進めている。

抗原特異的メモリーCD8T細胞の形成と維持におけるIL-15の役割:

矢島俊樹^{1,2}、西村仁志¹、桑野博行²、吉開泰信¹

(¹名大・医・病態研・生体防御、²群馬大・医・1外)

The role of IL-15 in generation and maintenance of antigen-specific memory CD8⁺T cells

Toshiki Yajima^{1,2}, Nishimura Hitoshi¹, Kuwano Hiroyuki² and Yasunobu Yoshikai¹

¹Laboratory of Host Defense, Research Institute of Disease Mechanism and Control,

Nagoya University school of Medicine,;

²First Department of Surgery, Gunma University School of Medicine

【目的】我々の研究室で作製したIL-15トランスジェニック(Tg)マウスにおいて、卵白アルブミンやBCGに対して強い抗原特異的Tc1細胞応答を示すことを明らかにした。本研究では、IL-15による抗原特異的なメモリーCD8T細胞の形成、維持分子機構を明らかにするため、リステリア感染IL-15TgマウスにおけるListeriolysin O (LLO)特異的CD8T細胞について検討した。【方法】BALB/c背景IL-15Tgマウス及びBALB/cマウスにリステリア(EGD株)を10⁶CFU腹腔内感染させ、経時的に脾臓T細胞を単離した。抗原特異的CD8T細胞の検出は、LLO₉₁₋₉₉ペプチド/H-2K^dテトラマーによる染色及び、LLO₉₁₋₉₉ペプチド刺激後の細胞内IFN- γ 染色によって行った。また、感染後7日目のBALB/cマウスよりCD8T細胞を単離しCFSEで蛍光標識後、非感染IL-15TgマウスもしくはBALB/cマウスに経静脈的に移入し、経時的にフローサイトメトリーを用いてメモリータイプCD8T細胞の動態を検討した。更にEGD株感染後3週間目のIL-15Tgマウスもしくはコントロールマウス由来CD8T細胞をBALB/cマウスに移入し致死量のリステリアにて再攻撃し免疫記憶について評価した。感染後誘導されてくる抗原特異的CD8T細胞における抗アポトーシス分子の発現についてRT-PCR及びフローサイトメトリーを用いた細胞内染色にて解析した。

【結果】リステリア感染後7、9日目においてLLO₉₁₋₉₉特異的CD8T細胞はIL-15Tgマウス及びコントロールマウス共に同様に誘導されたが、感染14日目で

は、IL-15TgマウスにおけるLLO₉₁₋₉₉特異的CD8T細胞がコントロールマウスに比べて有意に増加していた。感染21、35日目のメモリー維持の段階においてもIL-15TgマウスにおいてLLO₉₁₋₉₉特異的CD8T細胞がコントロールマウスと比べて有意に増加していた。移入後致死量のリステリア10⁶CFUにて再攻撃すると免疫IL-15Tgマウス由来CD8T細胞移入マウスにおいて顕著な菌の排除が認められた。蛍光標識後移入したCD44⁺CD8T細胞はコントロールマウスと比べてIL-15Tgマウスにおいて著明に分裂増殖を示していた。感染後誘導されてくるメモリーCD8T細胞における抗アポトーシス分子の発現についてRT-PCRにて調べると、IL-15TgマウスにおいてBcl-2の発現の上昇を認め、Bcl-XLの発現はコントロールマウスと顕著な差が認められなかった。また、細胞内Bcl-2染色においてIL-15Tgマウスでは感染後長期に渡ってBcl-2の発現が上昇していた。

【考察】IL-15Tgマウスにおいてリステリア感染後誘導される抗原特異的CD8T細胞は、形成の段階ではコントロールマウスと同様に誘導されるが、抗原特異的メモリーCD8T細胞の維持の段階において有意に増加していた。IL-15はBcl-2の発現を上昇させることによって活性化誘導細胞死を防ぎ、更にメモリー細胞を増殖させることによって維持していると考えられた。

IL-15 はマウス後天性免疫不全症候群の病態の進展を抑制する

◎梅村正幸¹・西村仁志¹・広瀬健二²・松口徹也¹・牧野正彦³・吉開泰信¹
 (1名大・医・病態研・生体防御、²感染研・細菌、³感染研・ハンセン病センター)

IL-15 prevents induction and progression of murine acquired immunodeficiency syndrome

Masayuki Umemura¹, Hitoshi Nishimura¹, Kenji Hirose²,
 Tetsuya Matsuguchi¹, Masahiko Makino³ and Yasunobu Yoshikai¹

¹Laboratory of Host Defense, Research Institute of Disease Mechanism and Control, School of Medicine, Nagoya University;

²Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases;

³Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

【目的】

昨年本学会において、我々はマウス白血病ウイルス(LP-BM5MuLV)を感染させた後天性免疫不全症候群(MAIDS)マウス MAIDS の病態形成の一方に IL-15 の産生抑制が関与しており、IL-15 の overexpression がその進展を抑制することが明らかになったことを報告した。本研究では、MAIDS の病態形成における IL-15 の生体防御での役割を IL-15 トランスジェニック(Tg)マウスを用いて、より詳細に検討し、さらに、IL-15cDNA を遺伝子銃を用いて接種することで MAIDS の進展を抑えることができるか試みた。

【方法】

4 週齢雌の C57BL/6(コントロール)マウス、もしくは C57BL/6 マウス background の IL-15 Tg マウスに LP-BM5 MuLV を腹腔内接種して MAIDS マウスを作製した。LP-BM5 MuLV 感染後 10 週目の MAIDS 発症の程度を脾臓やリンパ節の腫大および LP-BM5 MuLV の DNA integration を指標にした。腹腔内滲出細胞から単離した T 細胞は抗 CD3 抗体あるいは抗 TCR- $\alpha\beta$ 抗体で刺激し、細胞増殖活性を [³H]thymidine の取り込みで、培養上清中のサイトカイン量は ELISA で調べた。また、NK 活性は YAC-1 細胞を、抗原特異的な CTL 活性は MAIDS ウイルスの gag p12 の 10-mer のペプチド(p12-10)を EL-4 細胞に pulse したものをを用いて ⁵¹Cr-release assay で調べた。さらに、CMV を promoter として持つ発現ベクターにマウス IL-15cDNA を組み込ませ、それを遺伝子銃を用いて接種し、MAIDS の進展の抑制を調べた。

【結果】

IL-15 Tg マウスおよびコントロールマウスに LP-BM5 MuLV を感染させたところ、IL-15 Tg マウスでは有意に生存率が高まった。脾腫およびウイルス DNA integration の程度も有意に低かった。腹腔内滲出 T 細胞を刺激した結果、IL-15 Tg マウスは IFN- γ の産生低下を顕著に抑制していた。次いで、NK 活性は YAC-1 細胞を標的細胞として用い比較してみたところ、ほとんど活性を失ったコントロールマウスに比べ、IL-15 Tg マウスは有意に高かった。抗原特異的な CTL 活性は、明らかにコントロールマウスと比較して IL-15 Tg マウスの活性は高かった。その際の腹腔内滲出 T 細胞の IFN- γ 産生能を Intracellular cytokine FACS で調べると、IL-15 Tg マウスの CD8⁺ T 細胞からの産生が多い傾向であった。LP-BM5 MuLV を感染させると同時に、発現ベクターに組み込ませたマウス IL-15cDNA を遺伝子銃を用いて接種したところ、有意に生存率を高めた。

【考察】

MAIDS の病態の進展は IL-15 の産生不全が関与しており、IL-15 の overexpression がその進展を顕著に抑制することを明らかにしました。また、IL-15 遺伝子投与による抑制効果が良好であったことより、IL-15 遺伝子がレトロウイルス感染による免疫不全症の治療に有効であると期待される。

大腸菌死菌浮遊液の THP-1 細胞に対する TNF- α 活性誘導ならびに各種サイトカインの遺伝子発現の検討

©瀧口邦雄^{1,2}、稲川裕之³、西沢孝志³、本田晃子^{2,3}、杣源一郎³
1 マルホ・研究開発部、2 名古屋市立大医・生体高分子 3 徳島文理大・健康科学

[目的]

薬効成分として大腸菌死菌浮遊液を含有する痔疾治療薬は、痔核・裂肛の症状緩和ならびに肛門部手術創に汎用されている、他に類を見ない極めてユニークな薬剤である。この大腸菌死菌浮遊液には、感染防御作用や創傷治癒作用を示すことがこれまでに動物モデルを用いた実験で一部明らかにされている(1,2)。しかしながら、大腸菌死菌浮遊液の有効成分が何か、また、この成分がどのような薬理作用を示すかについて細胞レベル、分子レベルでの解析はほとんどされていない。

本痔疾治療薬は大腸菌死菌浮遊液がマクロファージを活性化し、活性化されたマクロファージから産生されるサイトカイン群が本質的な機能を果たすことにより薬理作用が発現すると我々は考えている。以上を明らかにする目的で、本研究は、大腸菌死菌浮遊液で刺激したマクロファージ様細胞株 THP-1 細胞の TNF- α 活性誘導能ならびに、サイトカインとレセプター類の発現を mRNA レベルで検討した。

[方法]

大腸菌死菌浮遊液はフェノール処理により死菌にした後に、菌数を測定し、残存するフェノールを PBS で透析することにより除去した。TNF- α 誘導活性はマクロファージ系培養細胞の THP-1 (2×10^5 cell/ml) に希釈した大腸菌死菌浮遊液を加え 3 時間培養し、上清中の TNF- α 活性(L-929 細胞傷害性)を測定することで評価した。各種サイトカインとサイトカインレセプター類の発現遺伝子は RT-PCR 法スクリーニングを行い、大腸菌死菌浮遊液 3 時間処理で誘導される mRNA について発現量を Competitive PCR 法で半定量的に測定した。

[結果と考察]

大腸菌死菌浮遊液の THP-1 細胞に対する TNF 誘導能を測定したところ、大腸菌死菌 1×10^8 cell/ml の濃度で 30 unit/ml の TNF- α 活性を誘導する用量依存

性が観察されたが、 1.5×10^8 cell/ml の濃度では変化が認められなかった。THP-1 細胞を大腸菌死菌浮遊液で 3 時間刺激することで、IL-1 β , IL-8, TNF, IL-12, IL-10, FGF- β の mRNA 産生が 10-300 倍増強していることを見出した。

我々は、これまで、ヒトやマウスに TNF を誘導することで MRSA 感染症の防御や、鎮痛効果が得られることを報告しているが(3)、本痔疾治療薬による感染予防や鎮痛の効果を発現する機構の一端は大腸菌死菌浮遊液が誘導する TNF 誘導活性が担うと考えられる。また、本研究で大腸菌死菌浮遊液は THP-1 細胞を直接活性化し、TNF- α 以外にも細菌感染防御に関連する IL-8 や IL-12、創傷治癒過程に関与する FGF- β 等を誘導する可能性を competitive RT-PCR 法により転写レベルで明らかにした。以上から、本痔疾治療薬を塗布した痔疾患部においては、マクロファージ活性化に伴い誘導されたこれらのサイトカインが、好中球や Natural killer 細胞等を活性化し、バクテリアやウイルス等の除去に働き、一方で、繊維芽細胞、血管内皮細胞に働き増殖を誘導することで、感染防御と創傷治癒作用に働くと考えられる。TNF はこれらサイトカインネットワークの中心的エフェクター分子として機能すると考えられた。今後、大腸菌死菌浮遊液の誘導する TNF を中心とするサイトカインネットワークの解析を含めて検討する予定である。

[文献]

1. 高橋耕一、他：強力ポステリザン軟膏の薬理作用。薬物療法、10: 1205-1215, 1977.
2. 青木隆一、他：炎症反応における白血球の役割。薬理と治療、2: 1463-1473, 1974.
3. 大矢和光、他：術後免疫機能低下に伴う細菌感染抵抗性の低下とその低下の TNF 術前投与による防止に関する研究。Biotherapy 7: 415-416, 1993.

カプトガニ抗菌ペプチドタキプレシンによるヘモシアニンのフェノールオキシダーゼへの機能変換

尾崎司¹、永井拓¹、川畑俊一郎^{1, 2, 3}

¹九大院・医・分子生命、²九大院・理・生物科学、³CREST

[目的]

甲殻類や昆虫のフェノールオキシダーゼ (PO) 系は、リポ多糖や β 1,3-グルカンに存在する特有の分子パターンを認識して生体防御反応を起動させる。最近、カプトガニヘモシアニンが、その体液凝固プロテアーゼの一つである Clotting enzyme と 1:1 の複合体を形成して、PO 活性を発現することを報告した (1)。今回、新たに、キチン結合性抗菌ペプチドがヘモシアニンの PO 活性を誘導することを見い出した。そこで、カプトガニの主要な抗菌物質で、17 アミノ酸残基からなる両親媒性のペプチドであるタキプレシンを用いて、ヘモシアニンとの直接の相互作用を解析した。

[方法]

表面プラズモン共鳴センサー (BIAcore) を用いて、センサーチップにヘモシアニンを固定化し、タキプレシンの親和性を速度論的に解析した。また、化学修飾したタキプレシンを用いて、ヘモシアニンと相互作用するアミノ酸残基を特定した。

[結果]

タキプレシンのヘモシアニンに対する結合速度定数は $6.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、解離速度定数は $2.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ であり、その値から算出される解離定数は $3.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ であった。また、タキプレシンのリシンやアルギニンの修飾はヘモシアニンとの結合にほとんど影響を与えなかった。一方、チロシンやトリプトファンといった芳香族アミノ酸がヘモシアニンとの結合には重要であることが判明した。また、ヘモシアニンはキチンに結合しないが、タキプレシンをコートしたキチンに対しては特異的に結合し、PO 活性を発現した。

[考察]

創傷部位に露出したキチンは抗菌ペプチドを吸着することでヘモシアニンが結合する足場として働き、機能変換されたヘモシアニンが生体防御因子として機能していると考えられる。

[引用文献]

1. Nagai, T., and Kawabata, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 29264-29267

原生動物タイヨウチュウのファゴサイトーシスを誘導する分泌性糖タンパク gp40 の機能

◎洲崎敏伸¹、坂口美亜子²

¹神戸大・理・生物、²ベルリン自由大

[目的]

原生動物の多くは、ファゴサイトーシスにより餌を捕獲している。しかし、餌の捕獲に関わる細胞間認識機構や、ファゴサイトーシス誘導のメカニズムに関する研究はほとんどなされていない。タイヨウチュウ *Actinophrys sol* は原生動物の一種であり、球形の細胞体から軸足とよばれる長い針状の仮足を放射状に伸ばしている。餌となる小型の原生動物が軸足の表面に接触すると、餌を軸足に接着させて捕獲し、軸足を収縮させることによって細胞体の近くに引き寄せ、ファゴサイトーシスにより食胞へ取り込む。タイヨウチュウは、エクストロソームとよばれる多数の分泌小胞を軸足の表層に持っており、餌を捕獲する際にはその内容を細胞外へ放出する。この物質は捕食行動に関わる粘着性物質あるいは麻酔物質ではなかいかわれきたが、その機能や生化学的性質は全く不明であった。そこで、本研究では、エクストロソームが含有する粘着性糖タンパク質を単離精製し、このタンパク質が餌を接着させ、ファゴサイトーシスを誘導する機能を持つことを示した (Sakaguchi et al., 2001)。

[方法]

汽水産のタイヨウチュウ *Actinophrys sol* は、10%人工海水に有機物を添加した培養液で、餌の鞭毛虫 *Chlorogonium elongatum* と共に無菌的に培養した。gp40 は、冷凍・融解したタイヨウチュウを 1% Triton X-100 で可溶化し、ホモジナイズした上清より、Con A-agarose を用いてアフィニティー精製した。gp40 の局在性は、FITC-Con A を用いた蛍光顕微鏡観察と、Con A-gold を用いた電顕的観察により調べた。

[結果と考察]

これまでに、タイヨウチュウの分泌する接着物質が Con A 結合性の成分を含んでいることがわかっていた。そこで、無菌的に培養したタイヨウチュウから、ConA affinity chromatography により、Con A 結合タンパクを精製したところ、単一のタンパク質が回収された。このタンパク質 (gp 40) は、分子量約 40 kDa で、高マンノース型の糖鎖を含んでいた。Gp40 の細胞内局在

を電顕的 Con A-gold 法により調べた結果、エクストロソームへの局在と、捕食時には細胞外に分泌されて餌の鞭毛虫の細胞表面に結合することがわかった。精製した gp40 の N 末端アミノ酸部分配列の決定を行った結果、15 残基のアミノ酸配列が明らかとなった。ホモロジーサーチによる検索の結果、相同性の高いタンパク質は得られず、gp40 は新規のタンパク質であることが分かった。この糖タンパク質の機能を探る目的で、gp40 を結合したアガロースビーズや、精製 gp40 の、餌の鞭毛虫やタイヨウチュウ自身に対する効果を調べた。gp40 結合ビーズは、餌の鞭毛虫に対して強い接着効果を示した。また、タイヨウチュウ自身に対してはファゴサイトーシスを誘導することがわかった。gp40 の添加により、エクストロソームの放出や、近接するタイヨウチュウ同士を接近させ、細胞融合を引き起こす効果を持つことなど、捕食に関与する多くの細胞機能に関係することが明らかとなった。

真核生物における生体防御機構の進化を考える上で、原生動物のファゴサイトーシスの仕組みを解明することは重要である。さらに、原生動物の捕食行動が細胞内共生の第一のステップとなり、様々な段階を経て多細胞の生物へと進化を遂げたことを考えると、原生動物のファゴサイトーシスの分子機構を解明することは、共生進化の過程を知るための有力な手がかりともなりうる。本研究で、タイヨウチュウ *Actinophrys sol* の持つエクストロソームには、餌の認識と、ファゴサイトーシスの誘導といった、抗体や補体と機能的に類似した性質を持つ糖タンパク質である gp40 が含まれていることが判明した。このことは、免疫系の分子的起源や共生進化の起源を考える上で、興味深い。今後は、gp40 の cDNA クローニングを行い、他の生物のタンパク質との類縁性を検討するとともに、gp40 に対するレセプター分子の探索も行っていく予定である。

[文献]

Sakaguchi, M., Murakami, H. and Suzuki, T. *Protist*, 152: 33-41 (2001).

ASABF 型線虫抗菌ペプチドと富システイン型軟体動物抗菌ペプチドとの特異な共通構造

◎張 紅、加藤祐輔

生物研・動物生命・発生機構

[目的]

ASABF 型抗菌ペプチドは、線虫類から分離された CS α β 型抗菌ペプチドの 1 種である¹。8 個の Cys による分子内ジスルフィド結合を 4 対有しており、グラム陽性および陰性細菌、および酵母に至る広い抗菌スペクトルを示す²。これまでに、豚腸管内寄生性線虫である *Ascaris suum* から 4 種 (ASABF- α , β , γ , δ) および遺伝学的モデル生物として用いられている *Caenorhabditis elegans* から 2 種 (ABF-1, 2) を報告した³。本演題では、ASABF 型抗菌ペプチドと、他の CS α β 型抗菌ペプチドの構造を比較した結果見いだされた、軟体動物由来の抗菌ペプチドとのみ共通する特異な構造について報告する。

[方法]

新しい ASABF 型抗菌ペプチドファミリーをコードすると考えられる *C. elegans* の遺伝子 *abr* (antibacterial-factor related)-1 および *abr-2* の cDNA クローニングは RACE 法を併用した PCR を基本とした方法によって行った。

[結果と考察]

ASABF 型抗菌ペプチドの 8 個の Cys の位置を、他の CS α β 型抗菌ペプチドおよび類縁したペプチドと比較した。7 つの Cys の位置は全てに共通していたが、1 つは ASABF 型抗菌ペプチドと軟体動物由来の抗菌ペプチド (MGD および myticin) のみに認められた。また、分子内ジスルフィド結合を形成する Cys の組み合わせも、この両者のみが一致していた。

この両者のみが一致していた。

抗菌ペプチドの多くは、分泌シグナル領域、前駆領域、および成熟ペプチド領域からなっている。CS α β 型抗菌ペプチドでは多くの場合、前駆領域は分泌シグナルと成熟ペプチド領域の間に位置する。しかし、ASABF 型抗菌ペプチドと軟体動物由来の抗菌ペプチドでは、前駆領域は C 末端に位置していた。

また、軟体動物の抗菌ペプチドの前駆領域は共通して強い酸性を示していた。既に報告した ASABF 型抗菌ペプチドでは、ごく短い C 末端前駆領域しか認められなかったが、新しくクローニングした *C. elegans* 由来の ASABF 型抗菌ペプチドファミリー *abr-1* および *abr-2* には長い前駆領域が見いだされた。*abr-1* では、軟体動物と同様に、前駆領域は強い酸性と見積もられた。

以上の結果から、ASABF 型線虫抗菌ペプチドと富システイン型軟体動物抗菌ペプチドは、構造上、CS α β 型抗菌ペプチドの中で特異なサブグループを形成していると結論した。

1. Kato, Y. and Komatsu, S (1996) *J. Biol. Chem* **271**(48), 30493-30498.
2. Zhang, H. et al. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(10), 2701-2705.
3. Kato, Y. (2000) *Dev. Comp. Immunol.* **24**, S19.

魚類の LBP/BPI ホモログの遺伝子クローニングと構造解析

◎稲川 裕之¹ 本田 晃子¹ 西沢 孝志¹ 乙竹 充²
 中西 照幸³ 横溝 祐一⁴ 杣 源一郎¹
 1 徳島文理大・健康科学 2 養殖研・病理 3 日本大・生物資源・
 獣医 4 動物衛生試・免疫

[目的]

近年、哺乳類においても獲得免疫を含む免疫機構が十分に機能する上で自然免疫機構の役割が必須であるとの認識がなされている(1)。自然免疫機構の生物学的重要性の理解を深めるためには、系統発生的観点から自然免疫を構成する諸因子の機能を解析する研究方法が有用であると考え(3)。そこで、我々は特異免疫系を担う免疫レパートリーを有する動物種なかで自然免疫系が優位な動物種と考えられる魚類に着目しているが、哺乳類に比べ、サイトカインや自然免疫に関連する分子についてほとんど知られていない。

ところで、LPS binding protein (LBP)と Bactericidal/permeability increasing protein (BPI)は自然免疫機構における異物識別分子として重要な役割を担っている(3)。そこで、本研究では、魚類の LBP, BPI 遺伝子ホモログをクローニングし、その構造と機能を比較免疫学的に調べることを目的とした。

[方法]

LPS をニジマスに投与し、発現誘導のかかる遺伝子を Subtraction hybridization 法を用いて選択した。ニジマス頭腎の mRNA より作製したライブラリーを用いて cDNA をクローニングした。遺伝子のホモロジー解析は BLAST 法を用い、進化系統樹は近隣結合法で解析した。LBP 遺伝子の mRNA 量は Competitive PCR 法で半定量的に測定した。

[結果と考察]

SSH 法により哺乳類の LBP とホモロジーを有する遺伝子が LPS 刺激でニジマス頭腎に誘導されるこ

とを見出した。cDNA ライブラリーから 2 種のニジマス LBP 様遺伝子(LBP/BPI1, LBP/BPI2)クローニングした。これらの推定アミノ酸配列は哺乳類の LBP または BPI 対し、32-34%のホモロジーが認められ、Phospholipid transfer protein に 23-26%、Cholesteryl ester transfer protein に対して 20-21%のホモロジーが認められた。また、ニジマス LBP/BPI1, LBP/BPI2 は哺乳類で LBP と BPI が分離する以前の遺伝子ホモログである可能性が高い事が示された。

LPS 刺激 3 時間後のニジマス頭腎に発現する LBP/BPI2 は LPS 未刺激の頭腎での発現量に比べ 30 倍に増大することが認められたが、LBP/BPI1 は増加が認められなかった。従って、LBP/BPI2 の mRNA の発現量は炎症時に増加する可能性が考えられた。哺乳類の LBP と BPI は体内に入った LPS を最も早く識別する、自然免疫機構を制御する重要な機能を持つ。ニジマスの LBP/BPI 様遺伝子産物の LPS シグナル伝達や炎症反応制御等の生物学的解析は、哺乳類において種々の作用を有する LBP と BPI の機能について有用な情報を与えると考えられる。

[文献]

1. D. T. Fearon, Nature 388: 323, 1997.
2. J. A. Hoffman et al., Science 284: 1313 1999.
3. R. S. Jack et al., Nature 389: 742, 1997.

This work was supported by a Grant-in Aid from the Recombinant Cytokine Project provided by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan (RCP 2000-2230).

ニワトリ Toll-like receptor (TLR) の単離と機能解析

福井 理^{1,2}、井上 直和^{1,3}、野村 みどり¹、松本 美佐子¹、瀬谷 司¹

¹大阪府立成人病センター研究所・免疫、²奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科、

³大阪大学大学院・薬学研究科

Molecular cloning and functional characterization of chicken Toll-like receptors

Aya Fukui^{1,2}, Naokazu Inoue³, Midori Nomura¹, Misako Matsumoto¹, and Tsukasa Seya¹

¹Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases,

²Department of Molecular Immunology, Nara Institute for Science and Technology,

and ³Department of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

目的

近年、ショウジョウバエにおけるパターン認識レセプター Toll¹⁾ のホモログである Toll-like receptor (TLR) が哺乳類で数種報告された²⁾。TLR は Toll と同様、細胞外の leucine rich repeat (LRR) ドメイン数個と、細胞内の Toll/IL-1 receptor homology region (TIR) ドメインから構成される膜蛋白質群であり、外来異物の存在を伝えるレセプターであることが明らかとなってきている^{2,3)}。Toll/TLR からの情報は、ショウジョウバエでは抗菌ペプチドの産生を誘導する⁴⁾。一方、哺乳類ではサイトカインの産生誘導し、獲得免疫を活性化させるため、軟骨魚類以降の動物種において、TLR は基本免疫と獲得免疫の橋渡し役を担う分子であると考えられる⁵⁾。しかし、Toll/TLR の機能が生物の進化と共にどのように変化してきたのかは不明である。そこで、哺乳類以外の脊椎動物で TLR の単離および機能解析を行い、哺乳類のそれと比較することを試みた。

方法

ニワトリ TLR cDNA のクローニング

ニワトリのファブリキウス囊 cDNA ライブラリーを鋳型とし、縮重プライマーを用いて PCR 法により 2 種のニワトリ TLR (type1, type2) の cDNA をクローニングした。プライマーは、現在その機能の

一部が明らかにされているマウス TLR2、4 とショウジョウバエの Toll において保存されている部分を参考にして作成した。2 種のニワトリ TLR は、ニワトリ肝臓の 1st strand cDNA を用いてその全塩基配列を決定した。

ニワトリ TLR の組織分布

次に、2 種のニワトリ TLR の mRNA とタンパク質の組織分布を RT-PCR と immunoblot によって解析した。RT-PCR で用いたプライマーは、開始メチオニンの直前にあるイントロンをまたぐように作成した。また、immunoblot で用いた抗体は、当研究室で作成した抗ニワトリ TLR ポリクローナル抗体である。

ニワトリ TLR のパターン認識レセプターとしての機能解析

ニワトリ TLR が、パターン認識レセプターとして機能しているかどうかを NFκB の活性化を指標にして検討した。2 種のニワトリ TLR 発現プラスミドと NFκB レポータープラスミドをヒト腎由来 293 細胞にトランスフェクションし、42 時間後に LPS または MALP-2 を加えた。37°C で 6 時間インキュベーションした後、細胞を回収、可溶化し、ルシフェラーゼ量を測定した。さらに、ヒト CD14 またはヒト MD2 をニワトリ TLR と共発現させた場合も検討した。

結果

単離したニワトリ TLR の type1 と type2 は、それぞれ異なる遺伝子から構成されていた。両タイプは、開始メチオニン付近と LRR ドメインの約 200 アミノ酸が互いに異なっているものの、共に一次構造上ヒト TLR2 に最も高い相同性を示した。その値は LRR ドメインで 45.3% (type1) および 46.3% (type2) であったのに対して、両タイプで全く同じである TIR ドメインは 80.7% と非常に高かった。

ニワトリ TLR 両タイプの mRNA およびタンパク質のニワトリ組織における発現分布を調べたところ、広範な組織でその発現が認められた。特に、結合組織においてそのタンパク質の発現が多かった。

ニワトリ TLR のパターン認識レセプターとしての機能を解析した結果、マイコプラズマ由来のリポペプチド MALP-2 をリガンドとしたときに、type2 を介した細胞応答が認められた。type1 でも応答が認められたものの、type2 の 1/3 から 1/2 程度であった。一方、大腸菌由来の LPS をリガンドとしたときは、type2 とヒト CD14 またはヒト MD2 を共発現させた場合にのみ応答が認められた。

考察

本研究において、部分的に配列が異なり、別の遺伝子から構成される 2 タイプ (type1, type2) のニワトリ TLR の cDNA を単離することに成功した。両タイプとも一次構造上ヒト TLR2 に最も相同性が高く、type2 については認識できる微生物や情報伝達系がヒト TLR2 と非常に類似していることを明らかにした。しかし、LRR ドメインの一部だけが type2 と異なる type1 の機能は不明である。以上の研究により、鳥類では遺伝子の重複によりできた複数の TLR がパターン認識レセプターとして機能しており、そのシステムは哺乳類のそれとは異なる可能性が示唆された。

文献

- 1) Lemaitre, B. et al., *Cell*, 86: 973 (1996)
- 2) Medzhitov, R. et al., *Nature*, 388: 394 (1997)
- 3) Rescigno, M. et al., *Immunol Today*, 20: 200 (1999)
- 4) Tauszig, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 10520 (2000)
- 5) Medzhitov, R. et al., *Cell*, 91: 295 (1997)

PU.1 as a Key Transcriptional Activator for the Expression of gp91^{phox} Gene in Human Myelogenous Cells

ORafiqul, M. I., Fan, C., Fujii, Y., and Nakamura, M.
(Dept. Biochem., Inst.Trop. Med. Nagasaki Univ).
islam-md@usa.net)

Gp91^{phox}, the large subunit of flavocytochrome b₅₅₈, is the key component of the phagocyte oxidase and transfers electrons from intracellular NADPH to extracellular or phagosomal molecular oxygen for the generation of microbicidal active oxygen. We previously reported that the gene of gp91^{phox} is positively regulated by PU.1 that binds to the PU.1/HAF-1 site centered at bp -53 of the gene. Several natural mutations occurred in this site result in loss of binding of PU.1 and HAF-1, and merges CGD characterized by the absence of the oxidase activity in neutrophils, monocytes, and B-lymphocytes but not in eosinophils.

[Purpose] Because PU.1 shares the binding site with HAF-1 that has Elf-1, an Ets protein, we aimed to clarify the factor that has a key role for the expression of gp91^{phox} gene in human myelogenous cells.

[Methods and Materials] Promoter fragment of gp91^{phox} gene from bp -105 to +12 was connected to upstream of firefly luciferase reporter gene in pXP2N plasmid. To 1.25 x 10⁵ TPA-treated PLB-985 cells in 0.25 ml, 1µg of the plasmid, 10 ng of renilla luciferase plasmid and 15 nmol TFL1 liposome (Dai-ichi Pharm. Co., Ltd) were added. and incubated for 16-24 hrs as reported previously (Hao, LJ, et al. J Biochem 128: 989, '01). EMSA was carried out by use of the labeled wild-type fragment from bp -65 to -41. One to three point mutations were introduced to these fragment by PCR. Nuclear extracts were prepared by the method

reported by E Schreiber et al (Nucleic Acids Res 17:6419, '89).

[Results] TPA increased the expression of gp91^{phox} gene as well as functional amounts of PU.1 and HAF-1. One-point mutations resulting in deficient expression of the gene lost binding ability to PU.1 and to HAF-1. Binding of constructs to either one of the two accompanied significant promoter activity. Mutations making the promoter highly active increased the binding of PU.1 but not HAF-1. Introduction of all possible combinations of -56G, 51G, and -49T that are consensus for Ets-binding element, made the promoter activity correlates to the binding affinity to PU.1 but not HAF-1. Co-transfections of dominant-negative and wild-type PU.1 decreased and increased, respectively the promoter activity.

[Conclusion] PU.1 is a dominant transcriptional activator for gp91^{phox} gene expression in monocytic PLB-985 cells. HAF-1 is a supplementary factor for the gene.

[Discussion] gp91^{phox} promoter activity dependent on PU.1/HAF-1-binding site was exclusively attributed to PU.1 in erythroleukemic HEL cells. In monocytic PLB-985 cells, however, this activity is not exclusively but dominantly dependent on PU.1. Mutations increased the binding to PU, increased the promoter activity by 4-14 times, suggesting these mutations to be valuable for the higher expression of the gene in future physiological gene therapy.

マウス胎仔血液における T 前駆細胞の同定

伊川友活, 河本 宏, 桂 義元
京大・再生研・免疫

【目的】

T 細胞は, B 細胞や他の血液細胞と同じように造血幹細胞に由来する. T 前駆細胞は胎仔肝臓(FL)や胎仔血液(FB)において検出されるが, これが胸腺へ移行する時期やその機構は不明であった.

我々はマウス胎仔胸腺(FT)の臓器培養にサイトカインを加える培養系で, 前駆細胞を 1 個ずつ培養する方法(Multilineage progenitor assay: MLP アッセイ)を樹立し, この方法を利用して T, B, ミエロイド系列へのコミットメントは胸腺とは無関係に FL で起こっていることを明らかにしてきた^{1,3)}. さらに FL 中には胎生 11 日目から Lin⁻c-kit⁺IL-7R⁺ (IL-7R⁺)細胞群が出現すること, しかもこの細胞群中には T あるいは B 系列に決定した前駆細胞(p-T および p-B)のみが存在することを明らかにした⁴⁾. 今回, FB 中における IL-7R⁺細胞群の出現時期と, この分画に含まれる前駆細胞の分化能を検討した.

【方法および結果】

胎生 10~15 日目の FB 細胞を lineage marker, c-kit および IL-7R で染色し, FACS を用いて解析した. IL-7R⁺細胞群の割合は FL と同じく胎生 10.5 日目から出現するが, 12 日目にピークに達し, 15 日目には消失していた.

デオキシグアノシンで処理した(dGuo-)FT lobe に, FB IL-7R⁺細胞を 1 個ずつ加えて V 型 96well プレートで SCF, IL-3 および IL-7 存在下に培養した. 10 日目に細胞を回収して FACS で解析し, 前駆細胞のタイプを特定した. その結果, FB IL-7R⁺分画中の前駆細胞の大多数は p-T であり, B 前駆細胞やミエロイド系前駆細胞はごく少数しか検出されないことが明らかとなった. FB 中の p-T は胎生 10.5 日目から検出され, 13 日目まで増え続けるが, その後急速に減少した. 一方, FL には 14 日目以降も p-T が存在していた.

個々の前駆細胞の T, ナチュラルキラー(NK)および樹状細胞(DC)への分化能を調べることでできる培養系を用いて, FB IL-7R⁺細胞の NK 細胞および DC への分化能を解析した. その結果, FB 中の p-T のほとんどは NK 細胞や DC への分化能を持つ, p-

T/NK/DC であることが明らかとなった.

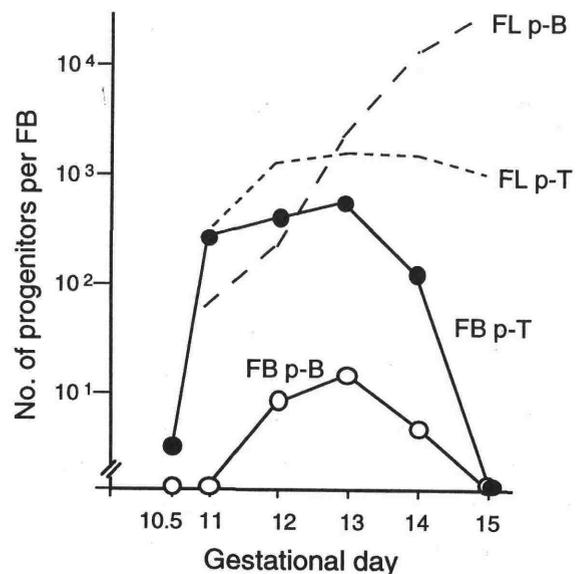
次に FB p-T の TCR β 鎖再構成前の増殖能を解析した. Rag-2^{-/-}マウスを前駆細胞ソースとして用いた解析から FB p-T は β 鎖再構成前に 1000 倍以上増殖することが明らかとなった. これは FL p-T の増殖能に相当する, 非常に強いものである. 1 個の前駆細胞が FT 臓器培養系で生成した T 細胞の D β -J β 再構成のパターンから再構成前の増殖を定量できる D-J signature analysis を用いて, 正常マウスにおいても同等の増殖活性が認められた.

【考察】

FB 中に検出される T 前駆細胞は, FL や初期の FT に検出されるものと同じく, NK 細胞および DC への分化能を持ち, 高い再構成前増殖能を持つことが明らかとなった. このことは p-T/NK/DC が胸腺へ移行すること, また, この胸腺への移行は主に胎生 11~13 日目に起こることを示している.

【文献】

- 1) Kawamoto, H. et al. *Int Immunol.*, 9: 1011, (1997)
- 2) Kawamoto, H. et al. *J Immunol.*, 161: 3799, (1998)
- 3) Ikawa, T. et al. *J Exp Med.*, 190: 1617, (1999)
- 4) Kawamoto, H. et al. *Immunity*, 12: 441, (2000)



Adult thymus 中の初期分化段階における T 前駆細胞が示す分化, 増殖能

陸敏, 河本 宏, 伊川友活, 藤本真慈, 桂 義元
京大・再生研・免疫

【目的】

Adult thymus(AT)中の earliest progenitors は CD4⁺CD8⁻群の中の c-kit⁺CD25⁻亜分画に含まれている。この分画の細胞群は, 従来の population level の assay で T 細胞, B 細胞, NK 細胞, 樹状細胞(DC)への分化能をもっていることが示されている。また, この分画の細胞は休止期にあるとされていた。次の c-kit⁺CD25⁺の段階に進むまでに 4-8 倍に増殖するとともに, T 系列への分化限定が起こると考えられていた。しかし, これらは細胞群を用いた実験からの推測にすぎず, 個々の前駆細胞の分化能や増殖の動態の多くは不明であった。本研究では, limiting dilution assay と single cell assay を用いて最も未分化な分画(c-kit⁺CD25⁺)の個々の前駆細胞の分化, 増殖能を詳しく解析した。

【方法および結果】

limiting dilution 法を用いて c-kit⁺CD25⁺段階での T, B 前駆細胞の frequency を調べた。4 週齢の mouse の AT において T 前駆細胞頻度は 1/6 であるのに対し, B 前駆細胞は 1/600 であった。10 週齢以上の mouse では, B 前駆細胞は殆ど検出されなくなった。従って, 殆どすべての T 前駆細胞はすでに B 系列への分化能を失っていることが明らかになった。

これら T 前駆細胞の NK および DC 系列への分化能を調べるために, green mouse の AT 前駆細胞を 1 個ずつデオキシグアノシン(dGuo)処理胸腺と共培養した。生成した細胞の一部を FACS assay にして T, NK 細胞の生成を調べ, 残った細胞は stroma 細胞株と共培養して蛍光顕微鏡にて DC の生成を調べた。その結果, earliest 分画の細胞は NK および DC への分化能を保持していることがわかった。NK および DC への分化能は分化段階の進行とともに少しずつ失われるが, c-kit⁺CD25⁺段階でも一部の細胞は T/NK/DC tripotent であった。これらの性質は胎仔胸

腺中の前駆細胞と共通している。

Rag2^{-/-} mouse AT 前駆細胞を用いて前駆細胞段階での増殖能を調べた。Rag2^{-/-} mouse の前駆細胞は TCRβ鎖再構成の時点(c-kit⁺CD25⁺)で分化, 増殖を停止する。従って, 個々の Rag2^{-/-} 前駆細胞の作り出す CD25⁺細胞の数は, その細胞のβ鎖再構成前の増殖能を示してると考えられる。c-kit⁺CD25⁺および c-kit⁺CD25⁻分画の個々の細胞を dGuo 処理 FT と共培養した結果, c-kit⁺CD25⁻前駆細胞は 10³-10⁴ 個の CD25⁺細胞を生成したのに対し, c-kit⁺CD25⁺前駆細胞では平均して 100 倍程度の増殖しかみられなかった。

次に, 正常 mouse T 前駆細胞の増殖能を調べた。Adult thymus の個々の細胞を dGuo 処理 FT と共培養した。一部分 FACS にて analysis し, 残りの部分は TCRβ鎖 DJ rearrangement を調べた。1 個の前駆細胞から作られた T 細胞に多くの DJ band が検出された場合は, β鎖再構成前に増殖があったことを意味する。Band の本数は増殖の程度を示していて, 定量的に評価することができる。結果は Rag2^{-/-} mouse を用いた実験と同じく, c-kit⁺CD25⁻前駆細胞は非常に強いβ鎖再構成前増殖能を有していることが示された。

【考察】

以上の結果から, Adult thymus の earliest T 前駆細胞は B 系列への分化能を失っているが, NK, DC への分化能は保持していることが明らかとなった。earliest の段階で増殖を開始しており, β鎖再構成までに 10³-10⁴ に増殖する。この結果は, 従来の population level の実験から推測されていた AT 中の前駆細胞に対するイメージを一新するものである。

マウス $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞による *Listeria monocytogenes*
感染初期の肝臓病巣形成の抑制

◎松崎吾朗, 原博満, 岸原健二, 吉村昭彦
九大・生医研・免疫制御

[目的]

細菌感染初期に, 感染部位に $\gamma\delta$ T細胞の増加が認められる。大腸菌感染で増加する $\gamma\delta$ T細胞は, $V\gamma 6/V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞が大多数を占めること, この $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞は他の repertoire の $\gamma\delta$ T細胞では代償されない事を昨年度の本学会で我々は報告した¹。一方, 細胞内寄生性細菌 *L. monocytogenes* 感染においても $\gamma\delta$ T細胞が増加するが, この $\gamma\delta$ T細胞は主に $V\gamma 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞と $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞からなる²。このうち, $V\gamma 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞が感染初期における菌の排除にかかわる事を我々は見出したが³, $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞の役割については明確でない。そこで, 本研究では, 我々の作成した $V\delta 1$ 遺伝子欠損マウス⁴を用いて, *L. monocytogenes* 感染における $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞の役割を検討した。

[方法]

$V\delta 1$ 遺伝子欠損 ($V\delta 1^{-/-}$) およびその heterozygous ($V\delta 1^{+/-}$) マウスを用いた。 $V\delta 1^{+/-}$ マウスに対して $1/2$ LD₅₀ (2.5×10^5 CFU) あるいは $1/10$ LD₅₀ (5×10^4 CFU) に相当する *L. monocytogenes* EGD 株を, これらのマウスの腹腔内に接種した。感染後, 経時的に臓器内菌数を測定するとともに, 生存率をモニターした。また, 感染5日目の肝臓の病理組織像を, HE染色で検討した。

[結果]

1. 臓器内菌数: $1/10$ LD₅₀ の *L. monocytogenes* を接種し, 感染4日目・8日目に脾臓と肝臓の臓器内菌数を計測した結果, $V\delta 1^{+/-}$ マウスと $V\delta 1^{-/-}$ マウスとで, 有意な差は認められなかった。

2. 生存率: $1/2$ LD₅₀ の *L. monocytogenes* を感染させて生存率を検討した。14日の観察期間中, $V\delta 1^{+/-}$ マウスは90%の生存率を示したのに対して, $V\delta 1^{-/-}$ マウスは感染4日よりマウスの死亡が認められ, 感染9日までに全てが死亡した。

3. 組織像: $1/10$ LD₅₀ *L. monocytogenes* 感染5日目の肝臓の組織像を検討した。 $V\delta 1^{+/-}$ マウスでは小さな肉芽腫様の単球/マクロファージの集簇が認められたが, $V\delta 1^{-/-}$ マウスでは, それに加えて, 好中球の浸潤と肝細胞の壊死からなる巨大な病巣が認められた。

[考察]

今回の研究から, *L. monocytogenes* 感染において, $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞は菌排除には積極的に参加しないが, 肝臓の壊死性病巣の形成を抑制することで感染初期防御に働くことが示唆された。これは, もう一つの $\gamma\delta$ T細胞亜集団である $V\gamma 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞が感染初期の菌排除に働くことと対照的である。この TCR V 領域特異的な $\gamma\delta$ T細胞機能の発現メカニズムについては, 今後のより詳細な解析が必要とされる。

[引用文献]

1. Matsuzaki, G. et al. *Eur. J. Immunol.* 29:3877, 1999.
2. Fujise, S. et al. *J. Immunol.* 157:247, 1996.
3. Nakamura, T. et al. *Immunology*, 96:29-34, 1999.
4. Hara, H. et al. *J. Immunol.* 165: 3695, 2000.

真菌に対する Th1 誘導及び感染防御における V α 14+ NKT 細胞の役割

◎川上和義¹, 金城雄樹¹, 屋良さとみ¹, 上江洲香織¹, 高口善信¹, 宮城一也¹,

中山俊憲², 谷口 克², 斎藤 厚¹

(¹琉球大・一内, ²千葉大・免疫発生)

〔目的〕近年、感染防御免疫における innate immunity の重要性が注目されている。その担当細胞の中で natural killer T (NKT) 細胞は発見されてそれほど間がなく、感染免疫における役割や制御機構については未だ十分には解析されていない。今回我々は、酵母様真菌である *Cryptococcus neoformans* (Cn) に対する感染防御免疫誘導における V α 14+NKT 細胞の役割を明らかにする目的で、Cn 肺感染マウスモデルを用いて感染後の V α 14+NKT 細胞の動態及び V α 14+NKT 細胞欠損マウスでの Cn に対する Th1 サイトカイン産生及び遅延型過敏反応 (DTH) 反応、さらに感染経過について調べコントロールの野生型マウスと比較検討した。

〔方法〕8~14 週齢雄の J α 281 遺伝子欠損 (NKT-KO) マウスおよび野生型として C57Bl/6 マウスを用いた。これらのマウスに経気管的に Cn 臨床分離株 (YC-13) 1×10^6 を接種し、経時的に肺ホモジネートから DNase I, コラゲナーゼ処理後比重遠心法により白血球分画を分離、FITC 標識抗 CD3 抗体、PE 標識抗 NK1.1 抗体で 2 重染色しフローサイトメトリで解析した。V α 14+NKT 細胞を同定するために、ビオチン標識抗 V α 14 抗体、PE 標識 α -galactosylceramide (α -GalCer) -CD1d テトラマーも用いた。肺内での V α 14-J α 281 mRNA の発現動態も RT-PCR で調べた。Cn に対する Th1 反応における V α 14+NKT 細胞の役割を調べるために、感染マウスから分離した肺内白血球を抗原で再刺激して得られた培養上清中の IFN- γ 濃度を ELISA で測定し野生型及び NKT-KO マウス間で比較検討した。さらに、感染マウスの footpad に抗原を接種し、その腫脹の程度で

DTH 反応を調べ両マウス間で比較した。感染防御における V α 14+NKT 細胞の役割は、経時的に感染マウスの肺内生菌数を両マウス間で比較検討することで調べた。

〔結果〕Cn 感染後肺内では 1 週間頃をピークとする NKT 細胞の増加が観察された。その多くは V α 14+NKT 細胞であった。さらには、同様な時間経過で肺内に V α 14-J α 281 mRNA の発現増加がみられた。一方、感染後肺内には Th1 細胞の増加がみられたが、NKT-KO マウスでは有意に減少していた。Th2 細胞には一定の傾向はみられなかった。この結果と一致して、Cn に対する DTH 反応が NKT-KO マウスにおいて有意に低下していた。さらには、感染局所における真菌の排除も同マウスで遅延していた。

〔考察〕これまでに NKT 細胞は抗腫瘍免疫や自己免疫疾患の発症病態に深く関与すると考えられているが、感染防御免疫における役割については未だ意見の一致をみていない。これまでの報告では、CD1dKO マウスを用いた研究では結核感染には重要な役割を果たしていないという結果であり、逆に抗 CD1d 抗体を使った研究ではリステリア感染制御においてむしろ抑制的な関与が報告されている。今回の我々の結果からは、少なくとも Cn 感染防御免疫において V α 14+NKT 細胞が重要な役割を担っていることが示唆された。これまでの報告との相違の理由については未だ明かではないが、病原微生物によっては NKT 細胞の役割が異なっている可能性が推察される。今後は、この点についても検討していく必要があるものと思われる。

腸管寄生線虫の感染防御における CD80 と CD86

○渡辺直熙¹、前田啓子²¹慈恵医大・熱帯医学、²順天大・アトピー研

[目的]

腸管寄生線虫に対する一次感染後の排虫は T 細胞依存性の防御反応であることが知られている。これまで *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) の排虫には小腸の杯細胞が関与し、糞線虫 *Strongyloides venezuelensis* (Sv) の排虫では粘膜マスト細胞の関与が示唆されている。この 2 種の線虫は終宿主内で類似の生活史を営むにもかかわらず、その防御反応は特異的で交叉反応性は全くみられない。腸管粘膜における排虫現象は特異な免疫反応といえる。一方 T 細胞の活性化には costimulatory 分子の関与が重要とされている。抗原提示細胞上の CD80 と CD86 は T 細胞上の CD28 と CTLA4 (CD152) のいずれをも認識することから T 細胞機能発現の多様性を決定する因子として興味もたれている。今回 Nb と Sv の 2 種の線虫の自然界での終宿主であるラットを用いて排虫および Th2 免疫応答におよぼす CD80 と CD86 の関与について検討した。

[方法]

BN ラットに Nb3 期幼虫 3000 隻または Sv3 期幼虫 5000 隻を接種することで経皮的に感染させた。抗ラット CD80mAb (3H5) と抗ラット CD86mAb (24F) は感染 0、3、7 日後に 1mg ずつ腹腔内に投与した。防御能は糞便中の排出虫卵を指標とし、糞便 1g 当たりの虫卵数で表わした。血中の総 IgE 値は ELISA で測定した。末梢血好酸球数は Hinkelman 液で染色し算定した。

[結果・考察]

Nb は感染 6 日後から産卵がみられ、12~14 日後には排虫される。感染 7 日後および 9 日後の虫

卵数は抗 CD86 単独投与群および抗 CD80+抗 CD86 複合投与群で約 2 倍となり有意な増加がみられた。抗 CD86 単独投与群と複合投与群の間に虫卵数の有意差はなかった。このことから Nb の 1 次感染後の防御には CD86 が関与することが示唆された。以前に報告した Nb 感染マウスの実験では、CD80 または CD86 のいずれかがあれば防御の発現がみられることから、マウスとラットで T 細胞活性化におけるこれらの分子の関与に違いがあることがわかった。

Sv 感染では感染 9 日および 13 日後に、虫卵数は抗 CD80+抗 CD86 複合投与群でのみ有意な増加がみられ、各抗体の単独投与群と対照群との間には差を認めなかった。この結果は Sv の 1 次感染では CD80 または CD86 のいずれかがあれば防御が起こることを示唆している。またこの反応がマスト細胞依存性であることはマスト細胞欠損ラットにおける虫卵数が正常対照より有意に増加していることでも確認された。

以上の結果から Nb と Sv の防御発現における T 細胞活性化ではその機序の違いを反映して costimulatory 分子としての CD80 と CD86 の関与にも違いがあることが明らかになった。

Th2 免疫応答である IgE 産生と好酸球増多では Nb、Sv いずれの場合も感染 2 週間後に最も高値となる。総 IgE 値および好酸球数はいずれの感染においても抗 CD80+抗 CD86 複合投与群で有意な減少がみられ、単独投与群では対照群と差をみない。この結果は Nb 感染マウスにおける知見と同じであった。

トランスジェニック (OVA23-3) マウスを用いた鼻粘膜における
局所免疫応答機構の解析

◎山田高也^{1, 2)} 佐野啓介¹⁾ 小笠原圭子¹⁾ 鈴木達夫²⁾
川内秀之¹⁾

¹⁾ 島根医大・耳鼻科 ²⁾ 北里研究所病院・研究部

【目的】

鼻咽腔局所粘膜免疫応答の成立において、鼻咽腔隣接リンパ装置 (NALT) や鼻咽腔粘膜に動員されたリンパ球 (NP) が重要な役割を果たしていることを、wild type のマウスを用いた実験において、これまで報告してきた。今回は、卵白アルブミン (OVA) に特異的なヘルパー T 細胞クローン由来の遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (OVA23-3) を用い、NALT 及び NP の OVA 特異的抗体産生細胞、鼻洗浄液中の抗体産生量及びサイトカインについて検討したので、その詳細を報告する。

【方法】

SPF 環境下で飼育・維持した OVA23-3 雄マウス 6-9 週及び BALB/c マウス 6-9 週を用い、OVA 100 μg 、コレラトキシン (CT) 1 μg 点鼻群、OVA 100 μg 点鼻群、リン酸緩衝液 (PBS) 点鼻群の 3 群に分け、マウス右鼻腔にマイクロピペットを用い、2 日毎に 7 回点鼻 (2 μl) を行った。点鼻開始後経時的にマウスを屠殺し、NALT 及び NP よりリンパ球を採取し、抗原特異的 IgA と IgG 抗体産生細胞を ELISPOT 法にて測定した。また、鼻洗浄液を採取し、抗原特異的 IgA と IgG 抗体価及び IL-4、INF- γ を ELISA 法にて測定した。

【結果及び考察】

BALB/c マウスにおいては、PBS 点鼻群及び OVA 単独点鼻群では、NALT ならびに NP の抗原特異的 IgA、IgG は認められなかった。OVA と CT 併用点鼻群では、NALT 及び NP に OVA 特異的 IgA 及び IgG 抗体産生細胞が認められ、鼻洗浄液中の OVA 特異的 IgA 及び IgG 抗体価も上昇した。一方、OVA23-3 マウスでは、PBS 点鼻群では、NALT ならびに NP の抗原特異的 IgA、IgG は認められなかった。OVA と CT 併用点鼻群では、NALT 及び NP に OVA 特異的 IgA 及び IgG 抗体産生細胞が認められ、鼻洗浄液中の OVA 特異的 IgA 及び IgG 抗体価も上昇し、サイトカインの産生も認められた。さらに興味深いことに、OVA 単独点鼻群においても、NALT 及び NP に OVA 特異的 IgA 及び IgG 抗体産生細胞が誘導され、鼻洗浄液中の抗体価も上昇し、サイトカインも産生していた。以上の結果は、経鼻免疫において IgA を中心とした粘膜免疫応答を誘導する際、CT などの粘膜アジュバントが必要であった wild type のマウスの実験結果と異なっていた。本知見は、鼻粘膜での効率的な抗原特異的粘膜免疫誘導において、鼻粘膜局所に存在あるいは動員される抗原特異的ヘルパー T 細胞の頻度が重要な因子であることを示唆した。

コイ IgM アイソフォームの好中球貪食におよぼす効果

下 菌 真希¹・小玉 仁¹・森友 忠昭¹・中尾 実樹²
 ・矢野 友紀²・苫名 充³・井上 裕基¹・中西 照幸¹

(¹日大獣医 ²九大院生資環 ³日大応用生物)

<目的> 演者らはこれまでにコイ免疫グロブリン (IgM) の H 鎖遺伝子は 2 コピー存在することおよびタンパクレベルでも 2 種類の IgM

(IgM-1 および IgM-2) が存在することを報告している¹⁾。本研究では、IgM-1 および IgM-2 の好中球貪食作用への影響が異なることを見出したので報告する。

<方法>

IgM-1 および IgM-2 の精製：ヒツジ赤血球

(SRBC) または大腸菌加熱死菌で免疫したコイより血清を分離し非働化した後、ポリエチレングリコール分画, ゲル濾過 (Superdex200pg), イオン交換クロマトグラフィー (Q-SepharoseFF) により IgM-1 および IgM-2 を精製した。各分画を用いて凝集価を測定するとともに、Native-PAGE および SDS-PAGE の電気泳動等による解析を行った。

コイ腹腔好中球の分離：50~100g のコイ腹腔に大腸菌ホルマリン死菌 1 mg を接種し、12 時間後に腹腔内に遊走してきた細胞を採取した。腹腔内滲出細胞を Percoll 比重遠心法にて分画し、1.085 Percoll と Hanks 液との間のバンドを回収し、好中球浮遊液として使用した。

貪食試験：同一の凝集価となるように希釈した IgM-1 または IgM-2 溶液中で SRBC を感作した後、腹腔細胞と SRBC が 1:10 になるように混合し、25°C, 1 時間反応させた。反応後、Acridine orange (AO) 液を終濃度で 12.5 μg/ml になるように加え、2 分間染色後、蛍光顕微鏡下で観察し、細胞質がオレンジ色に染まる好中球のみを計数し、貪食率および貪食指数を求めた。大腸菌の場合、PI (propidium iodide) 標識した大腸菌加熱

死菌を IgM-1, IgM-2 それぞれで感作した後、同様に貪食試験を行い、フローサイトメトリーによる測定を行った。解析は、前方散乱光 vs. 側方散乱光ドットプロット上で、好中球集団にゲートをかけ、赤色蛍光強度のヒストグラム上に表し、蛍光強度の平均値を求めることにより行った。

<結果> IgM の精製：Q-Sepharose FF カラムを用いた NaCl 濃度勾配溶出処理において、IgM-1 は約 50 mM NaCl で、IgM-2 は約 200 mM NaCl 付近で溶出された。Native-PAGE では IgM-1 は若干 IgM-2 より陽極側に泳動されたが、SDS-PAGE では H 鎖, L 鎖の分子量には違いは無く、単位タンパク量あたりの凝集価にも差は認められなかった。

貪食試験：腹腔好中球の IgM-1 感作 SRBC に対する貪食率および貪食指数はそれぞれ、39.6%, 1.5 であった。一方、IgM-2 感作および未感作の SRBC に対する貪食率および貪食指数はそれぞれ 18.0%, 1.1 および 17.1%, 1.3 であり、IgM-1 に高いオプソニン作用が認められた。また、大腸菌加熱死菌を用いた貪食試験においても、IgM-1 感作大腸菌を貪食した好中球の平均蛍光強度は、IgM-2 感作および未感作のものよりも明らかに高い値を示した。

<結論> 2 種類の IgM のうち IgM-1 に高いオプソニン作用が認められ、これらアイソフォームは機能分化していることが分かった。

<文献> 1.M. Nakao *et al.* 1998): Isolation of cDNA encoding the constant region of the immunoglobulin heavy-chain from common carp (*Cyprinus carpio* L.) Fish & Shellfish Immunology, 8, 425-434.

呼吸器ウイルス感染病態における NO の役割

○岡本真一郎^{1,2}、赤池孝章¹、吉武 淳¹、菅 守隆²、前田 浩¹(¹熊本大・医・微生物、²同・第一内科)

【目的】多くのウイルス感染病態において、宿主の応答反応のひとつとして誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現に伴う一酸化窒素 (NO) の産生が確認されているが、ウイルスに対する NO の生体防御機能についてはよくわかっていない。我々はこれまで、マウスのインフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス感染病態において、iNOS 発現誘導に伴う NO の過剰産生がもたらされることを明らかにしてきた。さらに、これらのモデルに NO 合成酵素阻害剤である *N*^ω-monomethyl-L-arginine を投与することにより、肺内ウイルス増殖は全く影響を受けず、生存率が有意に改善することから、NO は抗ウイルス作用を発揮することなくむしろ病態の増悪因子として作用していることを報告した。さらに今回我々は、iNOS 欠損マウスを用いて、両ウイルス感染病態における iNOS および NO の役割について検討した。

【方法】C57BL/6J を遺伝的背景に持つ iNOS ホモ欠損マウス (iNOS^{-/-}) とその同胞マウスを用いて、2×LD₅₀ 量のマウス馴化インフルエンザウイルス A/Kumamoto/67 (H2N2)あるいはセンダイウイルス (Z 株)を噴霧感染させることにより致死的肺炎モデルを作成し、生存率、肺内ウイルス増殖、およ

び肺の各種病態生化学的所見について検討した。すなわち、肺内 NO 産生を電子スピン共鳴 (ESR) 法により、肺内ニトロチロシン生成を免疫組織化学法により解析した。

【結果】両感染モデルにおいて、野生型マウス (iNOS^{+/+}) は感染後第 6 日目より肺炎病態の急速な進行を認め、感染後第 8 日目から 14 日目にかけて大部分が死亡した。これに対し iNOS^{-/-} の生存率は有意に高く、iNOS^{-/-} ヘテロ欠損マウス (iNOS^{+/-}) は iNOS^{+/+} に近い経過を示した。肺内ウイルス増殖は 3 群間で変化を認めなかった。ESR 法による検討では iNOS^{+/+} で過剰な肺内 NO 産生が認められたが、iNOS^{-/-} では完全に、iNOS^{+/-} では約 1/4 程度に抑制されており、これに伴って肺内ニトロチロシン生成も抑制されていた。

【考察】以上の結果より、NO が生体内において生物学的に有意な抗ウイルス作用を発揮していないこと、iNOS による過剰な NO 産生がパーオキシナイトライトなどの反応性窒素酸化物の生成を介して組織障害的に作用していることが遺伝子欠損マウスを用いた実験系でも確認され、ウイルス感染病態における NO 産生阻害の有用性が示唆された。

NO およびニトロソチオールの抗アポトーシス作用を介する感染防御

田村文雄^{1,2}、赤池孝章¹、菅 守隆²、前田 浩¹
¹熊本大・医・微生物、²一内

Apoptosis induction by bacterial protease

Fumio Tamura^{1,2}, Takaaki Akaike¹, Moritaka Suga², Hiroshi Maeda¹

¹Department of Microbiology and ²First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine

<はじめに>

Streptococcal pyrogenic exotoxin B (SPE-B)として知られるチオールプロテアーゼによるアポトーシスの誘導が劇症型 A 群レンサ球菌感染症の病態発現に関与することが示唆されている¹⁾。細菌感染症におけるアポトーシスの誘導メカニズムの解明は、A 群レンサ球菌感染症のみならずその他の細菌感染症の病態を理解する上でも重要である。また、近年一酸化窒素 (NO) が生体内でアポトーシスの発現制御をしていることが明らかにされている²⁾。一方我々はこれまでに、ヒト α_1 -protease inhibitor (α_1 -PI) の S-ニトロソ体 (S-NO- α_1 PI) が強力な NO 供与体として抗菌活性や臓器保護作用などを発揮することを報告してきた³⁾。そこで今回、各種細菌性プロテアーゼによる U937 細胞のアポトーシスの誘導および NO や S-NO- α_1 PI などのニトロソチオールによる抑制効果について検討することにより、細菌性プロテアーゼによるアポトーシスの誘導メカニズムの解明を試みた。

<方法>

U937 細胞を、SPE-B、*Serratia marcescens* 56kDa protease、および *Pseudomonas aeruginosa* elastase などの細菌性プロテアーゼにより処理し、ethidium bromide-acridine orange 染色法により細胞死を測定した。NO 放出剤として propylamine-NONOate (P-NONOate)を、ニトロソチオールとして S-nitrosoglutathione (GS-NO)や S-NO- α_1 PI を用いた。また、細胞の caspase-3 活性を合成基質を用いて測

定した。抗アポトーシス蛋白の Bcl-2、c-IAP1 および hsp70 蛋白の発現量を細菌性プロテアーゼ処理後に Western blot 法にて検討した。

<結果>

SPE-B、serratial protease、pseudomonal elastase いずれにおいても濃度依存的に U937 細胞にアポトーシスを誘導した。また、SPE-B によって誘導された細胞死と caspase-3 活性は、P-NONOate、GS-NO や S-NO- α_1 PI により抑制された。serratial protease 処理細胞では、Bcl-2 の発現は変化なかったが、c-IAP1 は著明に減少し、hsp70 は逆に増加していた。

<考察>

細菌性プロテアーゼは宿主細胞のアポトーシスを caspase-3 の活性化を介して誘導することが示された。また、NO およびニトロソチオールは、細菌性プロテアーゼ誘導性アポトーシスを抑制することが明らかになった。さらに、細菌性プロテアーゼによるアポトーシスの誘導機序として、細菌性プロテアーゼによる宿主細胞内の c-IAP1 の分解が関与していることが示唆された。

<文献>

- 1) Chin-Feng Kuo et al., Infect. Immun., 67: 126-130 (1999)
- 2) Young-Myeong Kim et al., Circ. Res., 19: 84(30) 253-6 (1998)
- 3) Miyamoto Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 267: 918-923 (2000)

ラット C5a 受容体の組織分布解析

赤津裕康 1,2、阿部正義 4、三輪隆史 1、立山尚 3、前田誠司 1、岡田則子 2、

小島清秀 1、山本孝之 1、岡田秀親 2

1.福祉村病院・長寿研、2.名市大・医・生体高分子、3. 第二病理、4.福岡大・医・薬理

【 目的 】

感染、炎症等の初期応答において、補体は免疫機構を多面的に活性化する点で非常に重要な役割を担っている。その中で、C5a, C5a 受容体 (C5aR) はアナフィラキシー活性の中心的役割を担っている。今回、ラット C5aR に対するポリクローナル抗体を作成し、炎症モデル (LPS 投与) と正常状態における組織分布を検討した。

【 方法 】

- 1) Polyclonal 抗体の作製と機能解析：シーケンスから得られた、N末端のアミノ酸配列よりペプチド (EITYDYS DGT PNP DMP ADC, C は KLH とのコンジュゲートのため付加した) を兔に免疫し血清および精製抗体を得た。その特異性は、rat C5aR 発現細胞 (CHO) のフローサイトメトリー及びウェスタンブロッティング法により確認した。
- 2) 発現分布：ラット各臓器を免疫組織化学、ウェスタンブロッティング法およびノーザンブロッティング法により解析した。
- 3) ラットへの LPS 投与：5 mg/kg を腹腔内投与し 10 時間後にネプタール麻酔下で組織を取り出した。

【 結果 】

- 1) 抗体の特異性は、rat C5aR 発現細胞を用いた解析により、確認できた。
- 2) 免疫組織化学的解析では、外来抗原の暴露を強くうける、唾液腺、肺、腸管等の単核球細胞に C5aR の発現を認めた。一方、脾臓、卵巣では単

核球マーカー (ED1) 陽性細胞を認めたが、C5aR の発現はそれほど強くはなかった。

- 3) ノーザンブロッティング法では前回の報告同様、肺と脾臓で C5aR の mRNA が強く発現し、また肝臓、その他の臓器でもバンドが認められた。
- 4) LPS を腹腔に投与した後得た組織での解析において、肺、脾臓での mRNA の発現の増強を認めた。免疫組織化学的解析においては、肺、脾臓での染色性の増強に加えて、肝臓での Kupffer 細胞での発現増強を認めた。

【 考察 】

- 1) C5aR は環境により発現変化を認めた。
- 2) 肝臓での Kupffer 細胞では mRNA と蛋白レベルでの発現解離が認められ、早期応答のために C5aR が recycling をしている可能性が考えられる。
- 3) LPS 等による C5aR の発現増加は、LPS 感作後に、補体抑制膜因子に対する抗体の投与で生ずる致死性のショックやシュワルツマン反応にも関与している可能性も考えられる。

【 文献 】

- Akatsu, H., et al., cDNA cloning and characterization of rat C5a anaphylatoxin receptor. *Microbiol Immunol* 41: 575 (1997)
- Mizuno, M., et al., Inhibition of a membrane complement regulatory protein by a monoclonal antibody induces acute lethal shock in rats primed with lipopolysaccharide. *J Immunol* 162: 5477 (1999)

二つのMannose binding lectin (MBL) 分子型とMBL遺伝子多型の関係

寺井 格、小林 邦彦¹、松下 昌直²、宮川 浩²、真船 直樹³

北海道医療大学医療科学センター、¹北海道大学小児科、²帝京大学第四内科、³北海道大学病態医科学

Relationship between gene polymorphism of Mannose binding lectin (MBL) and two types of MBL molecule.

Itaru Terai, Kunihiro Kobayashi¹, Masanao Matsushita², Hiroshi Miyakawa², Naoki Mafune³

Insti. Med. Sci., Health Sciences Univ. Hokkaido,¹ Dept. Pediatrics,³ Dept. Laboratory Medicine, Hokkaido Univ. School of Medicine,² Fourth Dept. Internal Medicine, Teikyo Univ. School of Medicine

【はじめに】

Mannose binding lectin (MBL)は肝細胞で産生され、主に血中に存在して、糖鎖配列に基づく補体活性化に重要な働きを担う。MBLの構造遺伝子の変異はコドン52,54,57番目の三種類の変異が知られている。これらの変異がコラーゲンドメイン上に存在することにより、MBLの安定な立体構造の保持が妨げられ、分解が促進されるためMBL血中濃度の低下がもたらされると言われている。これらの内、日本人では、54番目のコドンGGC(Gly)からGAC(Asp)への変異(A/Bと命名)一種類のみが報告されている。MBLのプロモーター領域や非翻訳領域の多型性も血中MBL濃度に影響を与え、-550、-221、+4の部位に各々H/L、X/Y、P/Qと名付けられた三つの多型が知られている。ハプロタイプHY、LY、LXは各々血中MBLの高、中、低濃度をもたらす。

【方法】

MBLの遺伝子型の異なる血清につき、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行い、溶出液中のMBL濃度をELISAで測定することによりMBLの溶出パターンを検討した。また、マンナンあるいは抗MASP1抗体をコートしたプレートに溶出液を添加し抗MBL抗体で検出するELISAにて、各々マンナンへ結合したMBLあるいはMBL-MASP1複合体を検出した。

【結果】

(1) MBLの溶出パターンは三つの型に分けられた。

1型: ピーク1(大分子量:約750kDa)を主とし、血清MBLは高値を示す
HYPA/HYPA, HYPA/LXPA, HYPA/LYPA, HYPA/LYQA, LXPA/LXPA, LXPA/LYPA, LXPA/LYQA, LYPA/LYPA, LYPA/LYQA, LYQA/LYQA

2型: ピーク2(小分子量:約450kDa)を主とし、血清MBLは低値を示す

LYPB/LYPB, LXPA/LYPB

3型: ピーク1(大分子)とピーク2(小分子)がほぼ等量存在し、血清MBLは中間値を示す
HYPA/LYPB, LYPA/LYPB, LYQA/LYPB
1,2,3型は構造遺伝子(A/B)が各々野生型(AA)、ホモ(BB)、ヘテロ(AB)に相当したが、構造遺伝子がヘテロ(AB)にもかかわらずプロモーター領域の多型XYもヘテロの「LXPA/LYPB」のみは、ピーク1が極めて小さく2型を呈した。

(2) 1,2,3型共に、MASP1-MBL複合体はピーク1に一致して捉えられ、マンナンへのMBLの結合もピーク1に一致した。ピーク2ではMASP1-MBL複合体は検出されずマンナンとの結合も見られなかった。

(3) 長期間MBL血中濃度を追跡測定した患者の、MBL最高値あるいは最低値を示した血清につきMBL溶出パターンを検討した。MBL血中濃度の上昇に伴い、1型はピーク1が増大しピーク2は微々たる変化しか認められなかったが、2型はピーク2の増大に伴いピーク1の出現増大が認められ、3型はピーク1,2の両者の増大が認められた。増大したピーク1に一致してMASP1-MBL複合体の増加、マンナンへのMBLの結合の増加が認められた。

【考察】

(1) 構造遺伝子の遺伝子型は分子量に影響を与える。MBLの血中濃度の大小も主に構造遺伝子により決まるが、大分子(ピーク1)の濃度の大小は更にプロモーター領域の多型により決定される。

(2) 大分子(ピーク1)のMBLはMASP1と結合しやすく、MBL-MASP1複合体はマンナンと結合しやすいが、小分子(ピーク2)のMBLはMASP1ともマンナンとも結合しにくい。

(3) 急性相においては、レクチン経路に関与しないと考えられる小分子(ピーク2)の変異MBLも増加する。

ヒトMASP-1, MASP-2およびC1s遺伝子のプロモーターの構造と機能

遠藤雄一、高橋 実、蔵屋幹夫、松下 操、藤田禎三
福島県立医大・医・二生化

Characterization of human MASP-1, MASP-2 and C1s promoters
Yuichi Endo, Minoru Takahashi, Mikio Kuraya, Misao Matsushita and Teizo Fujita
Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

〈はじめに〉

ヒト補体レクチン経路においては、血清中のマノース結合レクチン (MBL) が異物表面の糖鎖を認識するのに伴い、MBLに結合したセリンプロテアーゼ、MASPが活性型になり補体系を活性化する。今回、我々はMASP-1およびMASP-2遺伝子の発現調節機構を解明し、MASP-1/2が惹起するレクチン経路の生理的意義を明らかにすることを目的として、両遺伝子のプロモーターを解析した。また、古典的経路を惹起するC1s遺伝子の発現調節機構と比較するため、ヒトC1s遺伝子のプロモーターについても同様に解析した。

〈方法〉

1) ヒトMASP-1, MASP-2, C1s cDNAをプローブとして、ヒトゲノムDNAライブラリーよりそれぞれの遺伝子の上流領域を単離した。また、遺伝子の転写開始点を5'RACEで決定した。上流領域の塩基配列を決定し、各種エレメント配列の有無を検索した。

2) 各遺伝子の上流領域2~3KbpをルシフェラーゼをレポーターとするpGL3ベクターに連結し、HepG2細胞またはHeLa細胞に導入しプロモーター活性を測定した。また、種々の欠失変異体を作成し、同様にプロモーター活性を測定した。

3) pGL3ベクターを導入したHepG2細胞にIL-6, IL-1 β あるいは γ -インターフェロン添加し、プロモーター活性に及ぼす効果を測定した。

〈結果〉

1) クローン化した各遺伝子の上流領域2~3Kbpのプロモーター活性について解析した結果、正常向きのコンストラクトは逆向きと比較し50~100倍高い活性を示した。また、HepG2細胞を宿主とした場合、HeLa細胞と比較し150~400倍高い活性が得られた。

2) 欠失変異体のプロモーター活性は、各遺伝子の転写開始点の100~200bp上流の欠失によって大きく低下し、基本転写因子の存在を示唆した。三遺伝子ともこの領域に明瞭なTATA-boxは存在しなかった。

3) IL-6はMASP-1とMASP-2のプロモーター活性に影響しなかったが、IL-1 β は30~80%増加させた。IL-1 β の効果はIL-6の共存によって消失した。一方、C1sプロモーターの活性は、IL-6, IL-1 β した添加によって約2倍に増加し、両者の共存によって4倍に増加した。 γ -インターフェロンは、MASP-1, MASP-2には大きくは影響しなかったが、C1sの活性を約3倍増加させた。

〈考察〉

三遺伝子のプロモーターは、HNF-5などのエレメントによって肝臓での特異的組織発現に作用していることが示唆された。サイトカインの効果から、C1sは典型的な急性期タンパクであることが示唆された。一方、二つのMASPにはその特徴は見られず、それぞれが関与する補体活性化経路の生理的意味のちがいを示していると考えられた。

先天性ヒト補体 C3 欠損症における異常 C3 の解析

塚本 浩、堀内孝彦、永江祥之介¹、姫路大輔、小山貴子、大塚淳司、北村 肇²、北野悦子²、原田実根
九州大学大学院病態修復内科学(第一内科)、¹九州大学大学院皮膚科学
²大阪府立看護大学医療技術短期大学部臨床検査学科

Analysis of abnormal C3 from inherited human complement C3 deficiency
Hiroshi Tsukamoto, Takahiko Horiuchi, Shonosuke Nagae¹, Daisuke Himeji,
Takako Koyama, Junji Otsuka, Hajime Kitamura², Etsuko Kitano², Mine Harada
Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical
Sciences, ¹Dermatology, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences,
²Department of medical technology, Osaka Prefectural College of Health Sciences

[目的]

我々は一昨年の本シンポジウムにおいて、先天性ヒト補体 C3 欠損症(C3D)患者の遺伝子解析を行い C3 ゲノム遺伝子のイントロン 38 の 3'スプライス部位の AG→GG 置換によりエクソン 39 の 84 塩基が欠失した mRNA が形成されることを報告した¹。今回、この mRNA より翻訳される異常 C3 (C3Δ(ex39))につき検討した。

[材料及び方法]

wild-type(wt)C3cDNA はトロント大学の Isenman 教授より供与を受けた。C3D 患者皮膚由来線維芽細胞より RNA を調製し、RT-PCR 法にて C3cDNA の nt3295 より 3'末端までを増幅し、エクソン 38、40 を含む部位を wtC3cDNA と組み換え、エクソン 39 が欠損した C3Δ(ex39)cDNA を作成した。wtC3、C3 Δ(ex39)cDNA を発現ベクター-pcDNA3 に組み込み、COS-7 細胞へ遺伝子導入し上清中の C3 を ELISA 法にて測定した。次に上清中および細胞内の C3 を抗 C3 抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて解析した。

[結果]

wtC3、C3Δ(ex39)cDNA を遺伝子導入した COS-7 細胞の上清中の C3 濃度はそれぞれ 120.2 ± 40.0 ng/ml、 2.3 ± 0.5 ng/ml であり、C3Δ(ex39)cDNA

を遺伝子導入した細胞の上清中の C3 は有意に低下していた($P < 0.02$)。ウエスタンブロッティングでは wtC3 は細胞内では proC3、上清中では α 鎖および β 鎖の二本鎖として認められたのに対し、C3Δ(ex39)は細胞内では proC3 として認められるものの上清中では検出できなかった。

[考察]

本 C3D の mRNA におけるエクソン 39、84 塩基の欠失は in frame での欠失のため、この mRNA から正常の C3 より 28 アミノ酸少ない異常 C3 (C3Δ(ex39))が翻訳されるはずである。今回の検討で C3Δ(ex39)は翻訳されるものの、細胞外への分泌の障害により、細胞内に停滞し、C3 欠損症の原因になっていると考えられた。分泌の障害は C3Δ(ex39)の folding の異常により小胞体からゴルジ装置への細胞内輸送が障害されるためと考えられる²。

[文献]

- 1)塚本 浩他, 第 36 回補体シンポジウム講演集. p69(1999)
- 2)Tsukamoto H. et al., J. Immunol. 156: 4901(1996)

博多抗原による補体レクチン経路活性化

松下 操、蔵屋幹夫、濱崎直孝¹⁾、辻村充志²⁾、白木 洋²⁾、藤田禎三
 福島県立医大・医・二生化,¹⁾九州大学大学院・医・臨床分子医学、²⁾福岡県赤十字血液センター

Activation of the lectin complement pathway by hakata antigen

Misao Matsushita, Mikio Kuraya, Naotaka Hamasaki¹⁾, Mitsushi Tsujimura²⁾, Hiroshi Shiraki²⁾ and Teizo Fujita
 Dept. of Biochem, Fukushima Med. Univ. Sch. Med.

¹⁾Dept. of Clin. Chem & Lab. Med., Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ.

²⁾Fukuoka Red Cross Blood Center

〈はじめに〉

フィコリンはコラーゲン様構造とフィブリノーゲン様構造を有する蛋白質のファミリーであり、血清中に存在するフィコリンはレクチン活性を示す¹⁾。ヒト血清には2種類のフィコリン (ficolin/P35 と博多抗原²⁾)があるが、ficolin/P35 には MASP-1, MASP-2, sMAP が結合しており、複合体が補体を活性化する³⁾。ficolin/P35 やマンノース結合レクチン (MBL) のように、レクチン-MASP 複合体による補体活性化を「レクチン経路」として捉えることができる。今回、我々は博多抗原の解析を行い、これが MASP や sMAP と複合体を形成して補体レクチン経路を活性化することを見出した。

〈方法〉

- 1) ヒト血漿の Cohn fraction III より、抗博多抗原モノクローナル抗体 (4H5)-Sephrose, lentil lectin-Sephrose を順次用いて博多抗原画分を得た。
- 2) 抗ペプチド抗体をプローブとして用いたイムノプロット法により MASP-1, MASP-2, sMAP を検出した。
- 3) ELISA プレートにコートした 4H5 に博多抗原画分を結合させた後、C4 を反応させて沈着する C4b を検出することにより、博多抗原画分の C4 活性化能を調べた。また、同様の C4 活性化の実験を *Aerococcus viridans* の産生する多糖 (PSA) を ELISA プレートにコートして行った。

〈結果〉

- 1) イムノプロット法により、博多抗原画分には MASP-1, MASP-2, sMAP が含まれていることがわかった。
- 2) 抗博多抗原モノクローナル抗体 (4H5) に結合した博多抗原画分により C4 が活性化された。なお、対照として用いた抗 ficolin/P35 モノクローナル抗体や抗 MBLモノクローナル抗体ではこの活性化は起こらなかった。
- 3) 博多抗原は *Aerococcus viridans* の産生する多糖 PSA に結合する⁴⁾。ELISA プレートの固定化 PSA に結合した博多抗原画分により C4 が活性化された。

〈考察〉

博多抗原は MBL や ficolin/P35 と同様に、レクチン経路を活性化することにより生体防御レクチンとして機能していると考えられる。

〈文献〉

- 1) Matsushita M. et al., Immunol. Rev., 180: 78 (2001)
- 2) Sugimoto R. et al., J. Biol. Chem 273: 20721 (1998)
- 3) Matsushita M. et al., J. Immunol., 164: 2281 (2000)
- 4) Tsujimura M. et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8: 454 (2001)

特発性膜性腎症における factor H の検討

遠藤守人、福家吉伸、玉野まり子、大澤 勲、藤田宜是、大井洋之

日本大学医学部・内科 2

Glomerular deposition and urinary excretion of factor H in patients

with idiopathic membranous nephropathy

Morito Endo, Yoshinobu Fuke, Mariko Tamano, Isao Ohsawa, Takayuki Fujita, and Hiroyuki Ohi

Department of Internal Medicine II, Nihon University School of Medicine

<はじめに>

Factor H は、C3b の不活性化あるいは C3/C5 転換酵素の解離失活の促進といった機能を有しており、分子量 150 kDa の主要な補体制御因子として血漿中に存在する¹⁾。近年、Factor H の遺伝的異常が膜性増殖性糸球体腎炎、溶血性尿毒症症候群といった腎疾患に結びつく²⁾ことが示されている。一方、膜性腎症においては、糸球体局所での補体活性化による C5b-9 形成が蛋白尿の出現に重要である³⁾ことが知られている。そこで今回我々は、膜性腎症の病態と Factor H との関連について検討した。

<方法>

対象症例：日大板橋病院にて腎生検を施行し、光顕、蛍光抗体法、および電顕により膜性腎症と診断、二次性を除外した 20 症例（平均年齢 50.3 歳、男性/女性；16/4）。

Factor H および補体成分の腎組織における局在：生検腎組織の凍結切片で一次抗体として monoclonal 抗体を用い、avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法により検討した。

尿中 Factor H の検出：sample として新鮮尿（採

尿後直ちに 10mM EDTA を加え、2000 rpm・10 分間遠心）を -70℃ 保存、immunoblotting を行い、ELISA（BTA TRAK ASSAY、Bio Diagnostic Sciences）により測定した。また同時に尿中 C5b-9（SC5b-9 EIA、QUIDEL）についても測定した。

<結果>

全症例において Factor H の糸球体係蹄壁への沈着が、C3b/C3c、C3dg、C5b-9 とともに認められたが、その染色強度は C3b/C3c と一致する傾向にあった。また、尿 sample について 2 種類の Factor H に対する monoclonal 抗体を用いた immunoblotting においては 150 kDa にのみ broad な band として検出された。ELISA によって測定した尿中 Factor H 値は、尿蛋白量、尿中 C5b-9 とは相関せず、疾患の stage の早いもので組織沈着の強い症例において高い傾向を示した。

<考察>

今回の検討において、immunoblotting の結果から局所での産生が注目されている hFHL-1 protein⁴⁾ の尿中への出現は明らかではなく、血漿中に優位に存在する 150 kDa の Factor H が膜性腎症患者尿

中に出現していることが示された。病期の早い段階では糸球体において活性型である C3b/C3c の強い沈着がその制御蛋白 Factor H とともにみられる一方、病期の進行に従って分解産物である C3dg のみが強い沈着を示すことから、膜性腎症の病態において、糸球体上皮で補体活性化が生じた場合速やかに制御機構が作用していることが推察される。尿中 Factor H が糸球体での沈着程度を反映することは、膜性腎症での疾患活動性を判断するひとつの指標となり得るものと考えられる。

<総括>

特発性膜性腎症患者尿中に Factor H が検出され、疾患の病態に関連している可能性がある。

<文献>

- 1) Liszewski M. K. et al., *Adv. Immunol.*, 61: 201 (1996)
- 2) Ault B. H., *Pediatr. Nephrol.*, 14: 1045 (2000)
- 3) Kon S. P. et al., *Kidney Int.*, 48: 1953 (1995)
- 4) Friese M. A. et al., *Mol. Immunol.* 36: 809 (1999)

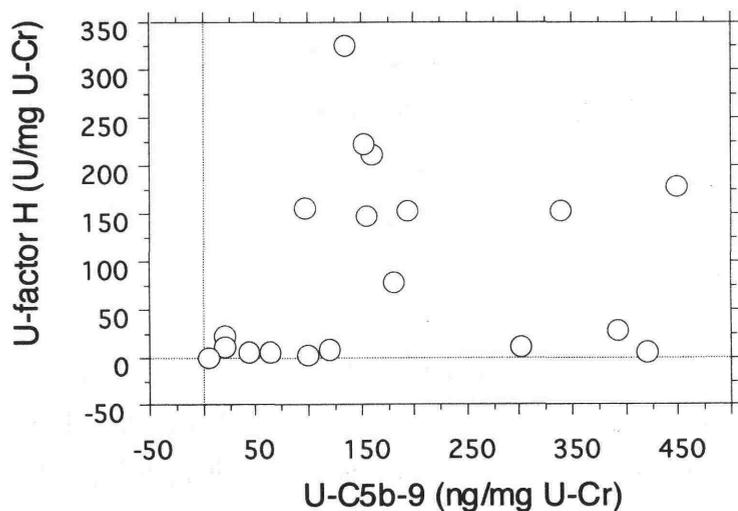


Figure. Urinary levels of factor H and C5b-9 in patients with idiopathic membranous nephropathy (n=20).

ヒト腎疾患における糸球体のC3aレセプターの分布についての検討

水野正司¹、西川和裕²、Philippe Gasque³、松尾清一¹

¹名古屋大医学部・第三内科、²愛知医科大学第一内科

³ウェールズ大学 生化学

Distribution of C3a receptor in human glomerulonephritis.

Masashi Mizuno¹, Kazuhiro Nishikawa², Philippe Gasque³ and Seiichi Matsuo¹

(¹The Third Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine

²The First Department of Internal Medicine, Aichi Medical University

³Department of Medical Biochemistry, University of Wales College of Medicine)

<目的>

各種炎症性疾患の発症・進展に補体が関与しており、特に炎症の急性増悪期には補体の関与が深いとされている。補体の活性化過程の産生物にアナフィラトキシンがある。アナフィラトキシンの中ではC5aに関する研究が先行しているが、最近ではもう一つのアナフィラトキシンであるC3aが注目されている。今回、我々は補体の活性化産物の中でも急性炎症に関与するとされるアナフィラトキシンの一つであるC3aに対するC3aのレセプター(C3aR)を認識する抗体を用いて、糸球体腎炎患者の腎生検で得られた組織におけるC3aRの分布を検討した。

<方法>

1998年から1999年の間、本院及び関連病院で行われた腎疾患に関する腎生検 83例について、コンパウンドに包埋した新鮮凍結組織から切片を作り、これをアセトン固定して使用時まで-70℃に保存した。染色及び組織評

価は組織採取2週間以内に行った。疾患の内訳は、微小変化型ネフローゼ 9例、IgA腎症 27例、膜性腎症 11例、膜性増殖性腎炎 4例、糖尿病性腎症 3例、巣状糸球体硬化症 5例、ループス腎炎 18例、半月体形成性腎炎 6例である。これらの標本に対してC3aRの分布を蛍光顕微鏡を用いて観察した。一次抗体には単クローン抗体RDIII-7 (抗ヒトC3aR抗体)を、二次抗体にはFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体を使用した。

上記症例の内、ループス腎炎の症例については、IFによるC3、C1q、C4の沈着の程度と、LMによる腎炎の分類と活動性(WHO分類)との間の検討を加えた。

<結果>

1) 得られた腎生検組織について、糸球体ではループス腎炎で18例中12例(66.6%)に糸球体に明らかに抗C3aR抗体の結合が認められた。他の糸球体疾患では、糸球体には有意な染色は観察されなかった。

尿細管はIF上ではすべての症例で陰性であった。

2) ループス腎炎のWHO分類による組織型については、II型 2例、IV型 14型、V型 2例で、I型、III型の症例は今回の観察中には存在しなかった。基本的にはII、V型では陰性で、IV型にのみ陽性の例があった。IV型の中でも活動性の高い症例程より強く染色される傾向にあった。また、組織学的に活動性の高い症例ほど、抗C3aR抗体が強く染色される傾向にあった。また、抗C3aR抗体はIgGやC3とほぼ同様の染色パターンでメサンギウム・内皮・上皮等に観察された。

<考案>

今回我々が観察した腎関連疾患の中で、補体の関与が強いと考えられる疾患、つまり、活動性の高いループス腎炎の組織でC3aRが観察された。一方で、糸球体に免疫染色上免疫グロブリンやC3の沈着が見られる膜性腎症、IgA腎症、膜性増殖性腎炎では、観察した範囲では抗C3aR抗体の染色は観察されなかった。なぜこのような疾患特異的な結果が得られたのかは実際の所不明である。今後、検討が必要である。

今回得られたC3aRの分布の傾向から、少なくとも使用した抗C3aR抗体がループス腎炎に特異的であることから組織診断の一助と成り得ると共に活動性の指標としても使える可能性が示唆された。

<結論>

1) ヒト抗C3aR抗体で各種腎疾患のC3aRの分布を調べた所、ループス腎炎の糸球体に特異的に結合が見られた。

2) ループス腎炎の中でもWHO分類で活動性の高いIV型でより強く抗体の結合が見られた。

3) 本抗体はループス腎炎の組織診断の一助として、活動性の指標としての有効性が期待される。

血栓形成性腎炎における thrombomodulin の抗炎症作用

丸山彰一、池口宏、森田良樹、藤田豊、松尾清一

名古屋大医学部・第三内科

Anti-inflammatory effects of thrombomodulin on the thrombotic glomerulonephritis

Shoichi Maruyama, Hiroshi Ikeguchi, Yoshiki Morita, Yutaka Fujita, and Seiichi Matsuo

(The Third Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine)

<目的>

ヒトの糸球体腎炎において血栓はしばしば観察される変化であり、血栓形成は腎炎の増悪因子のひとつと考えられている。近年、リコンビナントヒトロンボモジュリン(RHS-TM)が合成され、DICに対する有効性が確認されている。今回、ラットの血栓形成性糸球体腎炎モデルを用い、RHS-TMの効果についてヘパリンを対照として比較検討した。またそのメカニズムについても検討を加えた。

<方法>

家兔免疫抗ラット糸球体基底膜抗体、及び lipopolysaccharide を用い好中球浸潤を伴う血栓形成性糸球体腎炎を作成した。このモデルを用い以下の実験を行った。

<実験1> 1mg/kg または 3mg/kg の RHS-TM をそれぞれ腎炎惹起1時間後に静注した。さらに 83 U/kg/hr または 250 U/kg/hr のヘパリンを腎炎惹起1時間後から持続静注する群を作成した。陽性対照群には腎炎惹起後生食を静注した。以上の群につき5時間後に治療効果を比較検討した。

<実験2> 各治療群と未治療群(陽性対照群)

において、血清中のcarboxypeptidase R (CPR)の活性につき検討した。まず、血清中のtotal carboxypeptidase (carboxypeptidase N + CPR)活性を測定した。次にCPRの阻害剤であるpotato carboxypeptidase inhibitor (CPI)を加えた血清で同様にcarboxypeptidase活性を測定し、両者の差をCPR活性とした。

<実験3> 3mg/kg のRHS-TMを腎炎惹起1時間後に静注した群、腎炎惹起1時間前から1時間ごとに100 mg/kg のCPIを腹腔内に投与した上で3 mg/kg のRHS-TMを腎炎惹起1時間後に静注した群、さらに対照としてCPIのみを正常ラットの腹腔内に投与した群を作成し、5時間後の各糸球体内の好中球数をカウントした。

<結果>

<実験1> 3mg/kg のRHS-TMと250 U/kg/hrのヘパリンは完全に、1 mg/kg のRHS-TMと83 U/kg/hrのヘパリンは不完全に糸球体の血栓形成を抑制した。血清クレアチニン値はいずれの治療群でも対照群と比較し有意に低下していた。BUNはRHS-TM投与群では低下していたが、ヘパリン250 U/kg/hr投与群ではむしろ増加した。

これはこの群での消化管出血を反映したものと考えられる。好中球については、全ての腎炎惹起群で正常対照群に比較して有意に増加していた。そのうち RHS-TM 投与群では陽性対照群と比較して有意に好中球浸潤が抑制されていた。一方ヘパリン投与群では好中球浸潤に対する抑制効果は見られず、むしろ好中球数は増加していた。

〈実験2〉 正常対照群の血清では CPR 活性は検出感度以下であった。TM-thrombin complex は CPR を効率的に活性化することから血栓形成が起きている群では血清中の CPR 活性が上昇することが予想される。腎炎を惹起した陽性対照群では大量の血栓が形成されており、その CPR 活性は実際に有意に上昇していた。腎炎惹起後、十分に血栓形成を抑制する量のヘパリンを投与した群では陽性対照群と比較し、CPR 活性は有意に抑制されていた。腎炎惹起後、十分量の RHS-TM を投与した群では血栓形成は完全に抑えられているにもかかわらず、CPR 活性はむしろ上昇していた。

〈実験3〉 CPR 活性を選択的に阻害する物質である CPI を投与することで、CPR の関与につき検討した。腎炎惹起後 RHS-TM を投与した群では糸球体内にわずかな好中球浸潤が見られた。CPI を投与した群では、好中球数は増加した。つまり、CPI により CPR 活性を阻害することで RHS-TM の白血球浸潤に対する抑制効果は有意に減弱した。CPI のみを投与群では正常ラットと比較して好中球数は増加しなかった。

〈結論〉

ラットの血栓形成性糸球体腎炎モデルにおいて以下のことが確められた。

- 1) RHS-TM は出血傾向を来すことなく血栓形成と腎機能の低下を抑制する。さらに有意に糸球体への好中球浸潤を抑制する。
- 2) RHS-TM はヘパリンと比較して有意に CPR 活性を上昇させる。
- 3) CPI で CPR 活性を抑制すると RHS-TM の抗炎症作用が有意に減弱する。

〈考案〉

今回のモデルに対し RHS-TM は抗炎症作用を呈した。TM の抗炎症作用についてはこれまで主に肺や肝臓において報告されている。そのメカニズムとしては TM-thrombin complex による protein C の活性化を介するものとされ、CPR の活性化を介する抗炎症作用についてはこれまでに報告がない。我々はこれまでに当モデルに可溶性 complement receptor 1 または C5a receptor antagonist を投与することで血栓形成が抑制されることを報告している。今回我々は CPR がアナフィラトキシン (C3a, C5a) を不活化することに着目し、RHS-TM が CPR を活性化することにより抗炎症作用を呈するという仮説を立てた。今回の実験結果は RHS-TM の抗炎症作用の少なくとも一部は CPR の活性化を介するものであることを示唆し、この仮説を支持するものであった。

文献

- 1) Gomi K, Blood 1990, 75:1396-1399
- 2) Kondo C, Clin Exp Immunol 2001, in press

アレルギー性喘息病態における補体の関与

阿部正義¹、清水直美²、早志友里¹、坂田則行³、赤津裕康⁴、柴田和彦²、桂木猛¹、岡田秀親⁵
¹福岡大学医学部薬理学、²病態機能系、³第二病理学、⁴福祉村病院長寿医学研究所、⁵名古屋市立大学分子医学研究所

Contribution of complement activation to pathophysiology in bronchial asthma

Masayoshi Abe¹, Naomi Shimizu², Yuri Hayashi¹, Noriyuki Sakata³, Hiroyasu Akatsu⁴, Kazuhiko Shibata², Takeshi Katsuragi¹, Hidechika Okada⁵

¹Department of Pharmacology, ²Research Laboratory of Biodynamics, and ³Second Pathology, Medical School of Fukuoka University, ⁴Chouju Medical Institute of Fukushima Hospital, and ⁵Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine

(目的)

代表的なアレルギー性疾患である気管支喘息は異なる病態からなる複雑な疾患と考えられる。喘息患者が抗原を吸入すると、30分以内に起こる即時型気道反応(IAR)並びに4時間前後より起こる遅発型(LAR)の二相性反応がみられ、特にLARは炎症性細胞浸潤および気道過敏性を伴うことから慢性喘息の病態との関連より注目されている¹⁾。喘息の病態における補体系の関与については、喘息患者に抗原をチャレンジし、LARが出現した時点で血清総補体価(CH50)、C3、C4蛋白濃度の低下が認められなかったことより否定的であった²⁾。しかしながら、補体活性化産物であるアナフィラトキシンC5a、C3aには気道平滑筋収縮作用、メディエーター遊離作用があり喘息病態への関与が想定されていた^{3,4)}。

ごく最近になり、C3aRノックアウトマウスおよび先天的C3aR欠損モルモットを用いて、各感作動物に抗原をチャレンジすると、これらの欠損動物ではそれぞれの野生型に比し気道過敏性が減弱しているが、気道への細胞浸潤には変化がないことが報告された^{5,6)}。従って、本研究ではもう一つのアナフィラトキシンであるC5aに重点を置いて喘息における補体の役割を検討した。

(方法)

実験動物としては抗原抗体反応により遅発型反応を起こし易く、また抗原刺激によりIgE優位の免疫グロブリン産生増加を起こすBrown-Norwayラットを用いた。

1. 能動感作

体重200g前後の雄性B-Nラットに水酸化アルミニウム200mgと卵白アルブミン(OA)1mgを皮下投与し、同時に 6×10^9 個の百日咳死菌を腹腔内に投与し、3日後に水酸化アルミニウムとOAを追加投与し、初回投与から2-4週間後に実験に用いた。

2. 肺抵抗値(RL)の測定

ウレタン麻酔下に、気管切開しカニューレを気管内に留置し人工呼吸器に接続した。胸腔内圧を測定するためにバルーンを食道内に挿入し、気流速速度、一回換気量、および胸腔内圧と口腔内圧との差圧を測定しGilesらの方法⁷⁾によりRLを算出した(PULMOS-IIシステム)。

3. 肺の病理組織学的検討

炎症の評価を病理組織学的に検討した。刺激剤を気管内投与後6時間目に、肺を15cm水柱圧で経気道的に8%ホルマリン液を注入し固定した。組織はH-E染色後、顕微鏡下で炎症性細胞の浸潤その他を検討した。また、生理食塩水で気管支-肺胞洗浄(BAL)し得られたBAL fluidの総細胞数および細胞塗抹標本で顕微鏡下に細胞分画を測定した。

4. 肺のC5a受容体に対する免疫染色

固定した肺切片をラットC5a受容体ポリクローナル抗体と反応させEnvision(AP)システムを用い、New Fuchsinを基質として発色させ、免疫染色を行った。

5. 肺のC5aR、C3aR-mRNAsおよびサイトカインの発現

肺組織より総RNAを抽出し、C5aR、C3aRはノーザンブロット法で各サイトカインはRT-PCR法で発現の変化を調べた。

6. C5a、C3aとしては精製ラットC5a desArg、C3a desArg (Hugli博士より供与)を用いた。

(結果)

感作ラットに抗原(OA)を反復曝露すると遅発型優位の気道反応をおこし、また気道粘膜下組織に好酸球、好中球を中心とした著明な炎症性細胞浸潤が認められた。反復抗原曝露により肺でのC5aR-mRNAの発現は増加したが、C3aR-mRNAは有意の

変化を示さなかった。更に肺での C5a 受容体の発現を免疫組織化学的に検討すると、浸潤した好中球並びに肺胞マクロファージに発現が認められた。次に、補体系をその上流 (C3 および C5 転換酵素レベル) で阻害する、二種類の抗補体剤 (Futhan 並びに sCR1) で前処置してから抗原を曝露すると、いずれも IAR 並びに LAR を抑制したが sCR1 の方がより強く抑制した。病理組織学的にも反復抗原曝露による炎症性細胞浸潤は sCR1 前処置により著明に抑制された。

C5a 受容体拮抗剤 (hexapeptide) の前処置によっても遅発型気道反応並びに気道粘膜下への細胞浸潤はともに抑制された。これらの抗補体剤の前処置により肺での C5aR-mRNA の発現の増強は抑制され、サイトカイン (IL-4, 5, IFN- γ)、エオタキシンの発現も抑制傾向を示した。

更に、sCR1 前処置により補体系を阻害したラットに抗原とともに微量の C5a desArg (1 pmol 以下) を気管内に投与すると LAR 並びに気道粘膜下組織への炎症性細胞浸潤の両方を再現することができたが、C3a desArg では細胞浸潤のみ認められた。一方、好中球の走化性因子として重要な働きをしている IL-8 (CINC-1) は細胞浸潤を起こしたが LAR は惹起しなかった。

(考察)

気管支喘息は異なる病態かならる複雑な疾患と考えられる。近年、好酸球が喘息の効果細胞として重視されているが、重症の喘息患者のなかには気道に好酸球よりも好中球の方が著明に浸潤している病理像を示す一群があることが指摘されている⁸⁾。また気管支喘息患者の肺胞洗浄液中の好中球走化性因子として、C5a が主要な因子と報告されている⁹⁾。

一方、アレルギー反応に関するヒト並びに動物を用いた従来の研究は一回だけの抗原チャレンジによる反応が主に研究されてきたが、通常のアレルギー性疾患患者では慢性的に抗原に曝露され病態が形成されていると考えられるので、抗原を反復チャレンジすることにより起こる病態の方がよりヒトの疾患に類似していると思われる。実際、アレルギー患者に抗原を皮内注射で繰り返しチャレンジすると即時型反応は余り影響を受けないが、遅発型反応は三度目のチャレンジにより増強が見られた¹⁰⁾。本研究で示したように感作ラットに、抗原を繰り返し気道内に投与すると、やはり三度目の曝露により遅発型反応が増強され、更に気道周囲の粘膜下に炎症性細胞

浸潤を伴っていた。これらの気道反応 (気管支収縮、炎症細胞浸潤) は二種類の抗補体剤並びに C5a 受容体拮抗剤のいずれでも抑制され、逆に微量の C5a des Arg の投与により抑制は解除されることが確認された。一方、C3a 受容体に関しては別々のグループにより、ノックアウトマウス並びに欠損モルモットを用いて、各々の野生型に比し抗原チャレンジによる気道過敏性は低下していたが、気道への炎症性細胞浸潤には変化がないことが報告された^{5,6)}。本研究で C5a 受容体を検討した結果と併せて考えると、C3a 並びに C5a 受容体はアレルギー性喘息反応において異なる作用を演じていることが考えられる。以上より補体系の活性化、特に C5a の産生が本モデルでの遅発型反応の病態に深く関与していることが考えられた。

(結論)

抗補体剤、殊にアナフィラトキシン C5a 並びに C3a 受容体拮抗剤は新規の抗喘息薬に成り得る可能性が示唆される。

(文献)

- 1) Barnes, P.J., et al. *Pharmacol. Rev.* 50 : 515 (1998)
- 2) Durham, S.R., et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74 : 49 (1984)
- 3) Regal, J.F., et al. *Immunopharmacol.* 38 : 17 (1997)
- 4) Kodani, M. et al. *Immunopharmacol.* 49 : 26 (2000)
- 5) Humbles, A.A. et al. *Nature* 406 : 998 (2000)
- 6) Bautsch, W. et al. *J. Immunol.* 165 : 5401 (2000)
- 7) Giles, R.E., Finkel, M.P., Mazurowski, J. *Arch. int. Pharmacodyn.* 194 : 213 (1971)
- 8) Sur, S., et al. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148 : 713 (1993)
- 9) Teran, L.M., et al. *Clin. Exp. Allergy* 27 : 396 (1997)
- 10) Weller, F.R., et al. *Allergy* 51 : 883 (1996)

大腸癌患者便中 Decay-accelerating factor (DAF)と、 潰瘍性大腸炎患者便中 DAF のレクチン結合性の相違

岡咲博昭、水野元夫、那須淳一郎、水野将克、堀 伸一郎、楨殿知穂、平岡佐規子、
豊川達也、武 進、竹中龍太、岡田裕之、藤田禎三¹⁾、辻 孝夫
岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学、¹⁾ 福島県立医大・生化学第二

Difference in lectin-binding activity of decay-accelerating factor (DAF) detected in stools from patients
with colorectal cancer and ulcerative colitis

Hiroaki Okazaki, Motowo Mizuno, Jyunichirou Nasu, Masakatsu Mizuno, Shinichirou Hori,
Chiho Makidono, Sakiko Hiraoka, Tatsuya Toyokawa, Susumu Take, Ryuta Takenaka, Hiroyuki Okada,
Teizo Fujita¹⁾ and Takao Tsuji

Department of Medicine I (Gastroenterology, Hepatology, and Infectious Diseases),
Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry,
¹⁾ Department of Biochemistry, Fukushima Medical College

[目的]

大腸癌および潰瘍性大腸炎(UC)では、大腸粘膜における補体制御因子 Decay-accelerating factor (DAF) の発現が増強^{1,2)}、患者便中に発現が増強した DAF が検出される^{3,4)}。今回、大腸癌と UC 患者組織および便中に検出される DAF 分子の構造上の差異を明らかにするため、糖鎖構造の変化につきレクチンを用いて解析した。

[対象と方法]

大腸癌 10 例、UC13 例の患者より得られた大腸病変部組織と便、および対照として破碎処理した赤血球、白血球を用いた。組織および便中 DAF 量は、抗 DAF マウスモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法で測定した。DAF の糖鎖構造は、抗 DAF 抗体を固相化したプレート上に同濃度の DAF を含む検体を反応させ、次いで酵素標識各種レクチンを加えその結合性を検討した。また、組織

化学的に新鮮凍結病変組織を酵素標識レクチンを用いて染色した。

[結果]

病変組織、便とも UC 患者検体は、大腸癌に比べ UEA-I の反応が有意に強くみられ、この結合はフコースにより特異的に阻害された。UC 検体の UEA-1 結合性は、同濃度の DAF を含む赤血球、白血球の反応性よりも強く、この相違は UC 病変部に浸潤した白血球や出血の影響による差ではないものと考えられた。組織染色では、大腸癌、UC 組織ともに、UEA-I の細胞 apical 面での結合がみられた。

[考察]

大腸癌と潰瘍性大腸炎で発現する DAF にレクチン結合性において違いがあり、便中に検出される DAF にも同様の差が認められることが明らかとなった。

この UAE-I 結合性の差異は、組織学的に UEA-1 の結合性に大腸癌と UC の間で明らかに差はみられなかったことから、DAF に固有の変化である可能性が考えられた。

[結語] このレクチン結合性の差を検出できる便中 DAF 測定法の開発は、UC で発現する DAF と大腸癌で発現する DAF を区別することが出来る可能性があり、今後 UC 患者に合併する大腸癌の非侵襲的かつ簡便なスクリーニング検査として有用であると考えられる。

[文献]

- 1) Nakagawa M. et al., J Gastroenterol Hepatol, 16: 184, (2001)
- 2) Uesu T. et al., Lab Invest, 72: 587 (1995)
- 3) Mizuno M. et al., Gastroenterology, 109: 826 (1995)
- 4) Inaba T. et al., Clin Exp Immunol, 112: 237 (1998)

遺伝性血管神経性浮腫の一例

小西洋平, 加来倭磨, 筋浦立成, 松林 直
福岡徳洲会病院 内科

A case of hereditary angioneurotic edema

Yohei Konishi, Shizuma Kaku, Tatsunari Sujiura, Sunao Matubayashi
Fukuoka tokushukai Medical Center internal medicine

【はじめに】遺伝性血管神経浮腫は1888年オスラーによりクインケ浮腫より分離記載された皮膚粘膜の限局性浮腫を主徴とする稀な疾患¹⁾で、日本ではこれまで数十例報告されているに過ぎない。遺伝性血管神経性浮腫と思われる症例を経験したので報告する。

【症例】62歳, 男性。主訴は顔面, 口腔内, 頸部の腫脹。平成11年5月, 腹痛が出現し, 当院入院。十二指腸炎にて保存的治療を行い, 症状軽快し退院した。平成11年11月, 軽微な口腔損傷の後, 顔面, 口腔内, 頸部の腫脹が出現, 当院入院。ステロイドの投与を行い, 症状は数日で改善した。血管神経性浮腫が疑われ, 特に投薬なしで経過観察中であつたが, 平成12年10月, 睡眠中に頬粘膜を誤って噛んだ数時間後より顔面, 口腔内, 頸部の腫脹が出現し当院入院となつた。既往歴, 家族歴に特記すべきことはない。入院時, 顔面, 頸部, 口腔内に無痛性で搔痒および圧痕を伴わない浮腫を認めた。その他一般身体所見, 神経学的所見は異常なかつた。血液検査上, WBC 10100 (neutro. 66.1%, lympho. 24.6%, mono. 7.4%, baso. 0.6%, eosino. 1.3%), RBC 442万, Hb 15.5 g/dl, Hct 45.9%, Plt 29.6万, CRP 0.1mg/dl, γ -GTP 100 IU/l, TP 6.6g/dl, Alb 4.1g/dl, BUN 10.6 mg/dl, Cr 0.78mg/dl。補体ではC4 4mg/dl, CH50 7.4 U/ml, C1インアクチベーター活性 25%, 蛋白量 7mg/dlと低下を認め, C3 91mg/dl, C1q (ネフェロメトリー法) 10.5 mg/dlは正常であつた。抗核抗体, 抗DNA抗体, クリオグロブリンは陰性であつた。骨髓検査ではcerularityは30%とやや低かつたが, ME比は3-4:1, 異型細胞はなく, 染色体異常も認めなかつた。

以上より, 遺伝性血管神経性浮腫 (HANE) 1型と診断した。治療はサクシゾン800mg 1日, その後はプレドニン30mg 内服にて浮腫は約4日間で消失した。プレドニン内服は計1週間行い, 再発予防目的にてダナゾール100mg 内服にて約7ヵ月間再発はない。

【考察】血管神経性浮腫の機序については, C1 esterase inhibitorによりC1は制御されているが, 外傷, ストレス, 寒冷刺激, 運動, 感染症等の誘因により, プラスミンが活性化はされ, 多量の活性化C1が生じると, C2, C2b, C2キニンが活性化され, 血管透過性が亢進し, 浮腫が生じると考えられている²⁾。本例では軽微な口腔損傷により, 浮腫が誘発されたと思われた。

治療については, 急性発作, 短期予防, 長期予防にわけて行う必要がある。喉頭浮腫等の急性発作時には血液製剤のヒトC1インアクチベーター製剤の投与が効果的であるといわれ, 特に気管切開を要する程の重症例等では投与すべきと考えらる。短期予防として使用される薬剤は, 通常はアンドロゲン誘導体のダナゾール, スタノゾロールであるが, 特に小児, 妊婦ではヒトC1インアクチベーター製剤を用いるべきと言われる。長期予防としてはダナゾール単独, またはステロイドとの併用が最も用いられており²⁾, その他にはスタノゾロール, トラネキサム酸³⁾, イプシロン-アミノカプラン酸⁴⁾等の使用例が報告されている。本例では発症初期はステロイドを使用し, その後ダナゾールの少量投与にて再発予防を行い, 有効であると思われた。

【文献】

- 1) Osler W, Am J Med Sci 95 : 362-367 (1888)
- 2) Markovic SN et al, Ann Intern Med 132 : 144-150 (2000)
- 3) Agostoni A et al, Allergy 33 : 216-221 (1978)
- 4) Frank MM et al, N Eng J Med 286 : 808-812 (1972)

コイC5のcDNAクローニング

加藤陽子、中尾実樹、無津呂淳一、矢野友紀
九州大学大学院・農学研究院・水族生化学研究室

Cloning of the cDNA encoding C5 from the common carp (*Cyprinus carpio*)

Yoko Kato, Miki Nakao, Junichi Mutsuro and Tomoki Yano

Laboratory of Marine Biochemistry,

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

〈はじめに〉

補体C5は、細胞障害経路の成分として膜侵襲複合体の形成に重要な役割を果たすとともに、その活性化フラグメントC5aは強力なアナフィラトキシンとして種々の炎症反応に関与する。魚類では、ニジマスからC5タンパクが精製され¹⁾、cDNAの部分配列も示されている²⁾が、完全な一次構造は決定されていない。今回、コイC5の完全一次構造を決定することを目的とした。

〈方法〉

1. RT-PCR

ヒト、マウス、ニジマスのC5のアミノ酸配列中でよく保存された部分を基に混合プライマーを作成した。コイ肝臓total RNAからPowerScript (Clontech)とoligo (dT) primerを用いて1st strand cDNAを合成し、これを鋳型としてPCRを行った。

2. ライブラリーのスクリーニング

RT-PCR産物をDIGラベルしたプローブを用い、コイ肝臓cDNAライブラリーをスクリーニングした。単離したクローンをプラスミドに変換後、ABI377シーケンサーで塩基配列を決定した。

3. 3'-RACE

コイ肝臓total RNAから、SMART RACE kit (Clontech)を用いて3'領域を増幅し、増幅産物をpGEM-TまたはpCR-2.1TOPOベクターにサブクローニング後、塩基配列を解析した。

〈結果〉

RT-PCRによって、4種類のC5様cDNA断片が増幅された。これらのうち、典型的な配列を持つ2

クローン(clone 2およびclone 5)をプローブとして1クローンずつ(それぞれC5-1およびC5-2)を単離した。両クローンともに3'末端領域の一部を欠損していたので、3'-RACEによって欠損領域を補い、C5-1とC5-2の全塩基配列を得た。

C5-2の推定アミノ酸配列(1,684残基)は、 β 鎖- α 鎖に分割するプロセッシングシグナル配列を含み、C3のチオエステル部位に相当する配列はGSAEVに変異していた。また、C5転換酵素による切断部位の配列はよく保存されていた。

一方、C5-1の推定アミノ酸配列はC5-2と82%の同一性を示したが、C5転換酵素による切断部位のS1残基がArgからHisに置換されていた。

〈考察〉

コイでは、C3³⁾、C4⁴⁾、 α 2-マクログロブリン⁵⁾の場合と同様に、C5遺伝子も重複していると考えられる。複数のC5アイソフォームが、C3と同様に機能的にも多様化しているかどうかに興味深い。

文献

- 1) Nonaka, M. et al., J. Immunol., 126: 1495 (1981).
- 2) Franchini, S. et al., Immunopharmacology, 49 (1-2): 13 (2000).
- 3) Nakao, M. et al., Eur. J. Immunol., 30: 858 (2000).
- 4) Nakao, M. et al., Immunopharmacology, 49 (1-2): 12 (2000).
- 5) Mutsuro, J. et al., Immunogenetics, 51: 847 (2000).

ラクトフェリン(Lf)によるウシ補体第二経路 の活性化と黄色ブドウ球菌(SA)に対する除菌作用

貝 健三、小峯 健一、小峯 優美子、黒石 智誠、太田 實¹、北村 肇²、熊谷 勝男
(株) ティーセル研究所、¹東北大・農学部、²大阪府立看護大・医療短期大学部

Complement activation through the alternative pathway induced by bovine lactoferrin (Lf) resulting in growth inhibition of *Staphylococcus aureus* (SA).

Kenzo Kai, Ken-ichi Komine, Yumiko Komine, Toshinobu Kuroishi, Minoru Ohta¹,
Hajime Kitamura², Katsuo Kumagai

T-cell Research Institute, ¹Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tohoku University, ²Department of Clinical Laboratory Science, Osaka Prefecture College of Health Sciences.

[目的]

泌乳牛では、分娩が近づき泌乳活動が低下する時期になると、搾乳を停止して、乳腺に乾乳期を誘導する。その結果、乳腺では、リンパ球サブセットの変動と共に^{1~4)}、食細胞である多核白血球(Polymorphonuclear leukocyte: PMN)を中心とする多数の血液リンパ球の移入が起こる⁵⁾。そして、PMNには活発なラクトフェリン(Lactoferrin: Lf)蛋白の産生分泌が始まる。そして、我々は乳汁中から精製分離したLf蛋白を乳房炎に罹患した乳腺内に投与すると、乳房炎の発症を著しく抑制することを発見した(未発表)。

旧来から、このLfには、鉄(Fe)分子の結合性があり、それ自身に抗菌作用がある他に、食細胞への働きを介した制菌作用もあることが知られている^{6,7)}。この他、菌体に結合したLfには、ウシC1qが沈着することや⁸⁾、C4b2a形成を阻害することなどの補体成分との関連も知られているが⁹⁾、その詳細は明らかになっていない。我々は、そこで乾乳期における乳房炎防御機構の役割を更に検討しつつあるが、今日、Lfに新たに、補体第二経路を活性化し、食細胞の食菌能を高めるであろうという作用を見出したので、報告する。

[方法]

ホルスタイン乾乳期乳汁から乳汁細胞(Mammary gland secretory cell: MGSC)を分離し、貪食細胞として供試した。補体源は黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*: SA)抗体非保有の新鮮な

ウシ血清(Normal bovine serum: NBS)を用いた。

1) MGSCはギムザ染色により、顕微鏡下での形態学的な同定や、間接蛍光抗体法による染色によって解析した。

2) Lfによる補体活性化作用の有無はNBS+Lfの存在下で、Mg-EGTAの添加の下で反応後、50%溶血価から判定した。

3) SAへのC3沈着量は、SAのLf+NBS+Mg-EGTAあるいはNBS+Mg-EGTA存在下での反応後、測定した。LfとSA間の結合を確認するには、SA、Lfの結合、洗浄後にSAに、更にNBS+Mg-EGTAを加えて、反応させた。一部の処理区では、Lf抗血清をSAとLfの結合時に加えて洗浄後、間接蛍光抗体法によりSA表面のC3を染色して、flow-cytometryによりC3沈着量を解析した。

4) FITC標識SAは、Lf+NBS+Mg-EGTA存在下でオプソナイズして、洗浄後、MGSCと共培養した。洗浄後、MGSCをギムザ染色し、蛍光顕微鏡下でその食菌能を観察した。MGSCが取り込んだSA量はflow-cytometryにて解析した。

5) MGSCによるオプソナイズ化SA数の減少(食菌)作用は、各種のオプソナイズ処理を行ったSAをMGSCと共培養し、培地中の生菌数をカウントすることで確認した。

[結果]

1) MGSCの約60%がPMNおよびCD11b⁺(iC3bR⁺)細胞であった。

2) Lfは1mg/ml以上の濃度で、補体を活性化した。

この活性化は Mg-EGTA 存在下においても確認された。

- 3) SA を Lf+NBS+Mg-EGTA と反応させた場合、SA の C3 沈着量は 1mg/ml の Lf 存在下で最も増加した。SA と Lf を結合後に SA を洗浄し、後から NBS+Mg-EGTA を加えた場合においても、SA への Lf 結合を行わなかった場合に比べ、C3 沈着量は増加した。SA と Lf の結合時に Lf 抗血清を加えた場合、C3 沈着量は低下した。
- 4) SA を Lf+NBS+Mg-EGTA 存在下で反応した SA は MGSC に食菌されることが示された。食菌された SA 量は、SA+NBS+Mg-EGTA 処理に比べ、SA+Lf+NBS+Mg-EGTA 処理において明らかに増加していた。
- 5) NBS 単独でオプソナイズされた SA は、非オプソナイズ化 SA に比べ、菌数が低下していた。NBS+Lf でオプソナイズされた SA は、各処理区の中で最も菌数が低下していた。
- 6) 上記の 2),3),4),5)の反応については EDTA 存在下もしくは NBS の代わりに、非働化済み NBS を用いた場合には、補体の作用が確認できなかった。

[考察]

MGSC は、食細胞を豊富に含む細胞集団であった。

Lf は、NBS 中の補体に対して、第二経路を介して活性化することが示された。Lf はオプソナイズ時に、SA への C3 沈着量を増加した。このとき、最初に菌体へ Lf が結合し、続いて、SA 表面の Lf に C3 が結合していることが推察される。また、Lf が菌体表面で補体を活性化することにより、菌への C3 沈着が促進されることが考えられる。

つまり、Lf は、補体第二経路を活性化し、SA の C3 沈着量を増加させる結果、食細胞による食菌能を高め、共培養した SA 菌量を減少させる、つまり、除菌することが強く示唆された。

[結論]

乾乳期乳汁内の Lf(1mg/ml)は、SA に結合し、C3 沈着量を増加させる。この時、Lf は、やはり、乾乳期で乳腺内に増量する補体成分¹⁰⁾のウシの第二経路を活性化し、菌へのオプソナイズ化を高めるものと思われる。以上の機構によって、乾乳期乳腺内の Lf と補体は、この時期の乳腺の乳房炎の防除

に極めて重要な生理学的役割を果たしているものと思われる。乾乳期乳汁中の補体についても血清におけると同様に、Lf による補体第二経路の活性化の実際も検討する予定である。

[引用文献]

- 1) 熊谷勝男ら、臨床獣医, 15: 30 (1997)
- 2) 熊谷勝男、Milk Science 47: 35(1998)
- 3) Asai K et al., Vet. Immunol. Immunopathol., 65: 51 (1998)
- 4) Asai K et al., Vet. Immunol. Immunopathol., 73: 233(2000)
- 5) 小峯健一ら、日本畜産学会報, 70: J169 (1999)
- 6) Okutomi T. et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 18: 105 (1997)
- 7) Manfred G. et al., J. Leukocyte Biol., 49: 427 (1991)
- 8) Rainard P. et al., Immunology, 79: 648 (1993)
- 9) Kievits F. et al., Immunology, 54: 449 (1985)
- 10) Mueller R. Et al., Am. J. Vet. Res., 44: 747 (1983)

Inflammatory defects caused by GPI-anchor deficiency in macrophages

Wouter Hazenbos, Irmgard Förster¹, Björn Clausen¹, Junji Takeda² and Taroh Kinoshita
Dept. of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, ¹Institute for
Med. Microbiology, Immunology and Hygiene, Technical University Munich, and ²Dept. of
Environmental Medicine, Osaka University Medical School

Introduction.

Leukocytes express a variety of surface proteins that are linked to the cell membrane through the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor. Several studies, the majority of which being performed in vitro, suggest that GPI-anchored proteins participate in various leukocyte functions. In the hematological disorder paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), the GPI-anchor is absent on varying numbers of all types of leukocytes, due to a somatic mutation in the *PigA* gene (1, 2), which is essential for the biosynthesis of the GPI anchor (3), in hematopoietic stem cells. One of the main causes of death in PNH patients is infection, raising the possibility that GPI anchor-deficiency causes a loss of certain vital functions of the immune system. Little is known about the functions of the GPI-anchor on macrophages, which are major effector cells in inflammation and protection against infection. The purpose of this study was to investigate the function of the GPI-anchor on macrophages using a myeloid-specific GPI-anchor knock-out mouse.

Methods.

Myeloid-specific GPI-anchor knock-out mice were generated by using Cre/LoxP conditional targeting, in which LoxP-flanked *PigA* (4) was targeted through myeloid-specific expression of Cre recombinase (5). Expression of GPI-anchored proteins was analyzed using flow cytometry.

Macrophages were cultured in vitro with lipopolysaccharide, and the release of TNF- α into the culture supernatant was measured. Immune complex-mediated alveolitis was induced by intratracheal injection of the mice with IgG anti-ovalbumin and intravenous injection with ovalbumin. To determine the extent of inflammation, concentrations of TNF- α and interleukin-6, numbers of infiltrating neutrophils, and numbers of erythrocytes, in the bronchoalveolar fluid of these mice were measured.

Results.

Alveolar macrophages from these mice displayed a GPI-anchor negative phenotype, as determined by the lack of heat stable antigen and CD48 on their surface. These macrophages did not produce the proinflammatory cytokine TNF- α in response to low concentrations of lipopolysaccharide in vitro. After induction of immune complex-mediated alveolitis, an in vivo model for inflammation, several inflammatory parameters were impaired in these mice, including local production of the macrophage-derived proinflammatory cytokines TNF- α and interleukin-6, subsequent neutrophil infiltration, and hemorrhage.

Conclusion.

Thus, GPI anchor-deficiency in macrophages causes impaired responses to different

inflammatory stimuli in vitro and in vivo. This indicates that GPI-anchored proteins on macrophages have a nonredundant stimulatory function in inflammation. The observed decreased response of GPI anchor-deficient macrophages to lipopolysaccharide is consistent with previous studies using blood from PNH patients. The present study provides the first evidence that the GPI-anchor also contributes to immune complex-mediated inflammation.

References.

- 1) Takeda, J. et al. *Cell* 73: 703 (1993)
- 2) Kinoshita, T. et al. *Annu. Rev. Med.* 47:1 (1996)
- 3) Miyata, T. et al. *Science* 259:1318 (1993)
- 4) Tarutani, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7400 (1997)
- 5) Clausen, B.E. et al. *Transg. Res.* 8:265 (1999)

カタユウレイボヤ補体系遺伝子の網羅的解析

吉崎 史子、野中 勝
 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

Complement Genes of an Ascidian, *Ciona intestinalis*

Fumiko Yoshizaki, Masaru Nonaka

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo

《はじめに》 近年の研究により、補体系は後口動物の系統で獲得され、その後脊椎動物の系統で遺伝子重複などにより発展を遂げたことが示唆されている。¹⁾ 無脊椎動物の原始的な補体系の全貌を明らかにするために、EST解析やゲノム解析が進んでいるカタユウレイボヤを用いて補体系遺伝子の網羅的単離を試みた。

《方法》

- 1)カタユウレイボヤ肝臓 EST 解析
- 2)縮重プライマーを用いて血球 RNA から RT-PCR を行い、増幅断片を用いて血球 cDNA ライブラリをスクリーニングした。
- 3)カタユウレイボヤ発生段階 EST データベース (京都大学 佐藤研究室) に対して Blast Search を行い、得られたクローンで血球 cDNA ライブラリをスクリーニングした。

《結果》

1)MASP; 上記 1)の方法で脊椎動物およびマボヤ MASP と高い相同性を示す cDNA クローンを 2 種類単離し、推定コーディング領域の塩基配列を決定した。それぞれ CiMASPa、CiMASPb とした。CiMASPb は、serine protease domain を欠いた truncated type であり、その構造はコイ MRP²⁾と酷似していた。

2)C3・Bf; 上記 2), 3)の方法で 2 種の C3 の cDNA クローンを単離し、CiC3-1, CiC3-2, とした。CiC3-1 および CiC3-2 は脊椎動物の C3/C4/C5 と高い相同性を示し、 α - β プロセッシングサイト、チオエステル結合およびその開裂を触媒する His 残基はすべて保存されていた。Bf についても上記 3)の方法で単離した。

《考察》 今回の解析で、原始補体系の主要な構成成分と考えられる C3, Bf, MASP を単離した。分子系統樹による解析からいずれの遺伝子も脊椎動物における遺伝子重複に先行して分岐したことが示された。また、truncated type の MASP を無脊椎動物ではじめて単離した。ヒトでは truncated type の MASP(sMAP) が MBL-MASP 複合体に含まれることが知られ^{3) 4)} 調節的な役割を果たすことが示唆されている。この truncated type の MASP の存在が尾索動物までさかのぼって明らかになったことで、補体レクチン経路が尾索動物の段階で既に制御機構をも備えていたことが示唆された。

《文献》

- 1)Nonaka, M. Curr Opin Immunol 13: 69 (2001)
- 2)Nagai.T. et al. Immunogenetics 51:193 (2000)
- 3)Stover.C. M. et al. J Immunol 162:3481 (1999)
- 4)Takahashi.M. et al. Int Immunol 11:859 (1999)

Xenopus MASP-3 のcDNAクローニングと遺伝子構造の解析

柿沼雄二、遠藤雄一、高橋 実、松下 操、藤田慎三
福島県立医大・医・二生化

cDNA sequence and partial gene structure of Xenopus MASP-3
Yuji Kakinuma, Yuichi Endo, Minoru Takahashi, Misao Matsushita and Teizo Fujita
Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

〈はじめに〉

ヒト補体レクチン経路では、MBL(マンノース結合レクチン)・MASP(MBL結合セリンプロテアーゼ)複合体が補体系を活性化する。ヒトやXenopusには二種類のMASP, MASP-1とMASP-2が存在する¹⁾。最近、ヒトの血清より三番目のMASP、MASP-3が発見され、MASP-1遺伝子のalternative splicingによって作られることが明らかになった³⁾。同時に、二つのプロテアーゼドメインをコードするヒトMASP-1(MASP-1/3)遺伝子のユニークな構造が明らかになった。今回、我々はXenopusにおけるレクチン経路の分子構成とMASPの分子進化を解明するため、Xenopus MASP-3のcDNAクローニングと遺伝子構造の解析を行った。

〈方法〉

1) 既に報告されているMASPcDNAの配列をもとに degenerated primerを作成し、Xenopus肝臓cDNAを鋳型としてPCRを行い、MASP-3 cDNAの一部を得た。さらに5'RACEおよび3'RACEを行い、全長のMASP-3 cDNAを得た。

2) Xenopusの肝臓よりRNAを抽出し、Xenopus MASP-3 cDNAをプローブとしてNorthern blotを行った。

3) 既に報告されているXenopus MASP-1 cDNAの配列と今回得られたMASP-3 cDNAの配列をもとにプライマーを作成し、Xenopus genomic DNAを鋳型としてPCRを行い、遺伝子構造の一部を解析した。

〈結果〉

1) cDNAクローニングの結果、4.5 kbpと4.7Kbpの二種類のXenopus MASP-3 cDNAが得られた。両者はアミノ酸レベルで約92%の相同性があり、共にヒトMASP-3に約60%の相同性を示した。このうちの一つのH-chainは既に報告したXenopus MASP-1のH-chain¹⁾と同一であった。

2) Xenopus肝臓のNorthern blotの結果、4.8 KbのMASP-3の転写産物が得られた。その発現は、3.6KbのサイズをもつMASP-1転写産物と比較し、約半分量であった。

3) PCRによる遺伝子構造の解析の結果、Xenopus MASP-1/3遺伝子は、AGYタイプとTCNタイプの二つのプロテアーゼドメインをコードする領域をもち、ヒトMASP-1/3遺伝子と類似していた。

〈考察〉

Xenopusには、ヒトのMASP-1/3遺伝子とよく似た構造をもつ二種類のMASP-1/3遺伝子が存在し、そのalternative splicingによって、二種類のMASP-3が産生されていることがわかった。また、Xenopusには三種類のMASPが存在することより、Xenopusのレクチン経路の分子構成はヒトのものに極めて類似していると推定された。さらに、分子系統樹を作成し解析した結果、既に報告した下等動物(コイ、ドチザメ、ヤツメウナギ)のMASP¹⁾はMASP-3タイプであることがわかった。

〈文献〉

- 1) Endo Y. et al., J. Immunol., 161: 4924 (1998)
- 3) Dahl M.R. et al., Immunity (in press)

Membrane cofactor protein (MCP, CD46) 欠損マウスの解析

井上直和^{1,2}, 野村みどり¹, 中西友子³, 伊川正人³, 瀬谷司¹, 岡部勝³

¹大阪府立成人病センター研究所・免疫, ²大阪大学大学院・薬学研究科・病因病態,

³大阪大学遺伝情報実験センター・遺伝子機能解析分野

Analysis of MCP-deficient mice

Naokazu Inoue^{1,2}, Midori Nomura¹, Tomoko Nakanishi³, Masahito Ikawa³, Tsukasa Seya¹ and Masaru Okabe³

¹Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases

²Department of Clinical and Experimental Pathophysiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,

³Osaka University, Genome Information Research Center, Osaka University

[目的]

補体制御因子 MCP (CD46) は、自己補体の活性化から自己細胞を守る主要な因子である。ヒトの MCP は、いくつかの alternative splice form が存在し、ほぼ全域にわたってその発現が確認される。また、精子の先体部にも、ヒト MCP は発現し、その阻害抗体で精子と卵の結合、融合が顕著に阻害される¹⁾。このことから、MCP は従来の補体制御機能に加え、受精のステップに必要な因子であることが推測される。

一方、マウスの MCP は、発現分布が精巣に限られる²⁾。マウスでは全域に発現する *Crry* が補体制御の主要な因子であると考えられるため、マウス MCP は、ヒト MCP よりも精巣に特殊化したタンパク質であると考えられる。そこで、本研究では、MCP 欠損マウスを作成し、マウスの MCP の機能を解析することを目的とした。

[方法]

(1) MCP 欠損マウスの作成

MCP 欠損マウスを作成するために、MCP のエキソン 1-3 をネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲットベクターを構築し、ES 細胞 (D3) に形質転換した。相同組み換えを起こしたクローンは、サザンブロット法で選別し、キメラマウスを作成した。さらに、MCP ヘテロマウス (MCP^{+/-}) 同士の交配から、MCP ホモマウス (MCP^{-/-}) を産出した。

(2) 抗マウス MCP 抗体の作成と発現局在の同定

抗マウス MCP 抗体は、マウス MCP をウサギの腎細胞由来の細胞株 (RK13) に一過的に発現させ、その細胞をウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を得た。

この抗体を用いて、マウスの精巣上体より精子を抽

出し、免疫染色、flow cytometry によりマウス MCP の精子での発現局在を確認した。

(3) マウス MCP の受精能に関する解析

マウス MCP の受精能に関する解析は、雄の MCP 欠損マウスの平均産仔数、IVF (In vitro fertilization) による受精率、さらに透明帯や細胞膜への精子の結合数により観察した。

(4) 先体反応の速度に関する解析

先体反応の違いを解析するために、先体が GFP によって蛍光するマウスとの交配で、GFP ポジティブ MCP^{-/-}のマウスを作成した。また、野生型のマウスも同様の方法で得ている。これらのマウスから精子を抽出し、時間変化に伴う先体反応を flow cytometry を用いて観察した。

[結果]

マウス MCP は、ヒト MCP と同様に先体部に局在していることが分かった。さらにタンパク質レベルでも精巣特異的な発現が確認された。MCP 欠損マウスは、雌雄ともに健康に育ち、外見的にも何ら異常は認められなかった。また予想に反し、MCP 欠損雄マウスは、不妊にならず、むしろ野生型マウスと比較して平均産子数に若干の増加が見られた。精子が受精可能になるために必要な先体反応 (精子細胞膜と先体外膜との融合) を起こす速度を測定したところ、MCP 欠損マウスからの精子は、野生型よりも先体反応しやすくなっていることが分かった。これらの結果から、マウス MCP は、先体反応を制御する分子であると考えられた。

[文献]

- 1) Okabe M. et al., *Fertil. Steril.*, 54: 1121 (1990)
- 2) Tsujimura A. et al., *Biochem. J.*, 330: 163 (1998)

GPI アンカー欠損細胞は免疫担当細胞の攻撃に抵抗性である。 発作性夜間血色素尿症モデルマウスを使って

村上良子、小阪 博¹、竹田潤二²、木下タロウ

大阪大学微生物病研究所 免疫不全 ¹大阪大学医学部 皮膚科 ²大阪大学医学部修士環境医学

GPI anchor negative cells are resistant to immunological attack,
which is proved by using PNH model mice.

Yoshiko Murakami, Hiroshi Kosaka¹, Junji Takeda² and Taroh Kinoshita

Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

¹Department of Dermatology, Osaka University Medical School

²Department of Environmental Medicine, Osaka University Medical School

目的

GPI アンカー欠損症である発作性夜間血色素尿症(PNH)の発症には、造血幹細胞におけるX染色体遺伝子 *PIG-A* の体細胞突然変異とその異常幹細胞クローンの拡大が伴っている。我々は Cre/loxP システムを使って得られた *Piga* 欠損胎児の肝細胞を放射線照射をしたマウスに移植することにより血液系においてのみ *Piga* 欠損細胞を持つキメラマウスを作製、解析した結果、*Piga* 欠損細胞クローンの拡大は認められなかった¹⁾。即ち PNH の発症には *PIG-A* の変異に加えて第2の因子が必要であることが明らかになった。発症に到るためにはこの第2の因子によって、欠損細胞そのものが腫瘍的増殖を示す場合と、環境等の変化により欠損細胞が選択される場合の2通りの仮説が考えられる。われわれは後者の場合に焦点をあて、さらに PNH が再生不良性貧血と併発する症例が多いことから、第二の因子として自己免疫的な攻撃を想定して実験した結果、*in vitro* 及び *in vivo* で GPI 欠損細胞がその攻撃に抵抗性であるという知見を得たので報告する¹⁾

方法

1) マウスの胸腺腫細胞由来の cell line である EL4 細胞の *Pigf* 欠損株である class F の細胞²⁾に MHC class II α, β chain と膜貫通型 ovalbumin あるいは GPI アンカー型 ovalbumin を発現させ、それぞれに *Pigf* を戻して GPI⁺としたもの、あるいは空ベクターを戻して GPI⁻としたもののペアを作った。またこれらとは別に class F の細胞に MHC class II α, β chain を発現させ *Pigf* を戻して GPI⁺としたもの、あるいは空ベクターを戻して GPI⁻としたもののペアを作った。

2) MHC class II の I-A^b にのった OVApeptide を認識する TCR のトランスジェニックマウス (OTII)³⁾ のリンパ節より CD4 T cell を分離し、mitomycin C で処理をした 1)の EL4 OVA transfectant 各々と混ぜて MLR assay を施行した。

3) MHC class II I-A^b の β chain にアミノ酸変異があり正常の I-A^b をもつ細胞に対して CD4 T cell 依存性のアロジェニック反応をおこす bm12 マウスのリンパ節より CD4 T cell を分離し、mitomycin C で処理をした 1)の EL4 MHC class II

transfectant 各々と混ぜて MLR assay を施行した。

4) 致死レベルの放射線照射を行った C57BL/6 マウスに Cre/loxP システムを使って得られた Piga 欠損胎児の肝細胞とともに、bm12 マウスの CD4 T cell を移植し⁴⁾、個々のマウスの末梢血中の GPI アンカー欠損細胞の割合を解析した。

結果

EL4 OVA transfectant を使った MLR assay では、GPI アンカー型の OVA transfectant を抗原提示細胞とした場合、GPI⁺の時は T cell の増殖は起こるが、GPI⁻の時は、T cell の増殖は全くみられない。これは OVA peptide が I-A^b に提示されるためには OVA が細胞膜上に発現されることが必要で、Piga 欠損細胞では GPI アンカー型の OVA が細胞膜上に発現されないため、抗原提示が起こらず T cell の増殖はみられないと考えられる。即ち抗原が GPI アンカー型蛋白の場合 GPI 欠損細胞は免疫担当細胞の攻撃に抵抗性である。

また膜貫通型の OVA transfectant を抗原提示細胞とした場合、GPI⁺の場合と GPI⁻の場合とで T cell の増殖の程度を比較したところ GPI 欠損細胞では有意にその反応が低下していた。さらにアロの系である bm12 マウスの CD4 T cell を使った実験でも同様に GPI⁻の MHC class II transfectant は GPI⁺に比べて有意に反応が低下していた。このことはある GPI アンカー型蛋白が抗原提示細胞と T cell の反応のコファクターとして機能しており、GPI 欠損細胞はその機能がないために、免疫担当細胞の攻撃に抵抗性であることを示唆する。

血液幹細胞においても同じことが起こりうるか

を検証するために従来の PNH モデルマウスの作製時に bm12 CD4 T cell を同時に移植した。移植後約2ヶ月間はすべての lineage において GPI 欠損細胞が優位となっていた。このことは少なくとも multipotential の造血細胞では MHC class II が発現しており、GPI⁻の造血細胞が GPI⁺の細胞よりアロジェニックな T cell の攻撃に抵抗性があることを示す。即ち継続的に自己攻撃的な CD4 T cell が供給されれば GPI 欠損細胞は免疫担当細胞の攻撃から逃れて拡大することができることを示唆する。

総括

マウスモデルを用いて得られたこれらの結果は、GPI 欠損細胞が、免疫担当細胞の攻撃に対して抵抗性であることが PNH における GPI 欠損細胞のクローン性拡大に関係する因子の1つであるという仮説を支持するものである。今後 PNH 患者においても同様のメカニズムが働いているか検証したい。

文献

- 1) Murakami Y. et al., Blood, 94:2963(1999)
- 2) Inoue N. et al., J. Biol. Chem., 268:6882(1993)
- 3) Barnden M. et al.
Immunol. Cell. Biol., 76:34(1998)
- 4) Sprent J. et al., J. Exp. Med., 180:307,(1994)

PNHクローンの拡大に関わる候補遺伝子の同定

泉井朋久¹⁾、桑山真輝^{1,2)}、西村純一^{2,2)}、待井隆志²⁾、金倉 謙²⁾、木下タロウ¹⁾、井上徳光¹⁾

大阪大学微生物病研究所・免疫不全¹⁾、大阪大学医学部血液腫瘍内科²⁾

Identification of a candidate gene responsible for clonal expansion of PNH cells

T.Izui¹⁾, M.Kuwayama^{1,2)}, J.Nishimura^{1,2)}, T.Machii²⁾, Y. Kanakura²⁾, T.Kinoshita¹⁾, and N.Inoue¹⁾.

¹⁾Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

²⁾Department of Hematology and Oncology, Osaka University Medical School

【背景と目的】

発作性夜間血色素尿症(PNH)は補体制御因子であるDAFやCD59の欠損のため、自己補体による溶血発作を起こす後天性疾患である。これらの補体制御因子はグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)と呼ばれる糖脂質を介して細胞膜に発現している。

PNH患者の血球細胞においてはGPIアンカー型蛋白が全般に欠損しており、GPIの生合成に関わる遺伝子であるPIG-Aが原因遺伝子として同定されている。PNH患者ではPIG-Aの突然変異およびそれによるGPIアンカー型蛋白の欠損を示す血球細胞が全系統とも骨髓・末梢血中でクローン性に優位となることが知られている。

しかしながら当研究室および他の研究グループによるマウスホモログPig-aノックアウトマウスの解析では異常造血幹細胞のクローン性優位は導かれなかったことから、PIG-A以外の第2の異常がGPIアンカー型蛋白欠損細胞(PNH細胞)のクローナルな

拡大に関与していると考えられている^{1,2)}。

PNHクローンの拡大については、PNH細胞が自己免疫システムの攻撃から逃れうることによるとする選択説と、PNH細胞そのものが正常細胞を凌ぐ増殖能力を獲得するとする良性腫瘍説の2つの仮説が提唱されている。

当研究室で数年にわたって経過を追っているPNH患者ではPIG-Aの変異に加えて12番染色体の相互転座46XX, t(12;12)(q13;q15)をもつ血球細胞が優位となっている³⁾。興味深いことに、骨髓においてPIG-Aの変異を持つ細胞と、上記の染色体転座を持つ細胞は例外なく一致している。PIG-Aの変異と染色体転座が同一の造血幹細胞に起こっていることは、前述の良性腫瘍説を支持するものである。PNHクローンの拡大に染色体転座部位に存在する遺伝子の関与が示唆されることから、その遺伝子の同定およびクローニングを目標とした。

【方法と結果】

1.染色体転座の解析 昨年報告したように、患者由来の、転座をきたした12番染色体のいずれか1本を含むハイブリドーマを作成して解析を行った。STS (sequence tagged sites) マーカーと転座部位との位置関係を調べ、さらに近傍のヒトゲノム・ライブラリのBAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンの塩基配列と比較することにより、1塩基単位で転座部位を同定した。その結果、単純な相互転座ではなく、一方の12番染色体のq13-q15領域が欠失(deletion)し、それが他方の12番染色体のq15領域に挿入(insertion)されていることが判明した。

2.HMGA2/HMGI-C遺伝子 挿入が起こっている部位には既知の遺伝子HMGA2(high-mobility group protein A2)が存在し、挿入によって遺伝子が分断されていた。HMGA2はAT-hookと呼ばれるDNA binding domainをもつ転写因子であり、ヒトの脂肪腫や子宮筋腫などの良性腫瘍細胞において異常発現していることが知られている^{4,5,6}。このことから、HMGA2遺伝子の異常発現がPNH細胞のクローナルな拡大に関与している可能性があると考えられる。現在、HMGA2トランスジェニックマウスを用いて異常クローンの拡大を観察する一方で、ほかのPNH症例におけるHMGA2遺伝子の異常発現について解析を行っている。

3.その他の転座部位 HMGA2領域以外にも染色体転座部位や転座に伴う欠損領域があり、その領域に存在する遺伝子を検索中である。

【参考文献】

- 1.Murakami Y. et al., Blood, 94:2963(1999)
- 2.Tremml G. et al., Blood, 94:2945(1999)
- 3.Nishimura J. et al.,
Am J Hematol., 62:175(1999)
4. Schoenmakers EF. et al.,
Nat Genet., 10:436(1995)
- 5.Ashar H. R. et al.,Cell, 82:57(1995)
- 6.Goodwin G.,
Int J Biochem Cell Biol. ;30:761(1998)

C3aおよびC5aに対するCarboxypeptidase NとCarboxypeptidase Rの反応性

William Campbell^{1,2}, 岡田則子¹, Eliada Lazoura^{1,2}, 岡田秀親¹

1)名古屋市立大学医学部分子医学研究所、2)福祉村病院長寿医学研究所

【目的】CPNは血漿中に活性型で存在するBasic carboxypeptidase (CP)であるが、CPRは前駆体のProCPRとして血漿中に存在する。ProCPRは、thrombin、plasmin等のtrypsin様のプロテアーゼによって活性化される不安定な酵素であるので、新鮮血清中には存在するが、1時間ほどで不活化されてしまう。これらのCPがアナフィラトキシン不活化酵素としてC3aやC5aにどのような基質特異性を持つかを比較解析するため、C3aおよびC5aのC末端のそれぞれの8アミノ酸を合成し、それらを基質として、CPNおよびCPRによる加水分解反応を比較解析した。

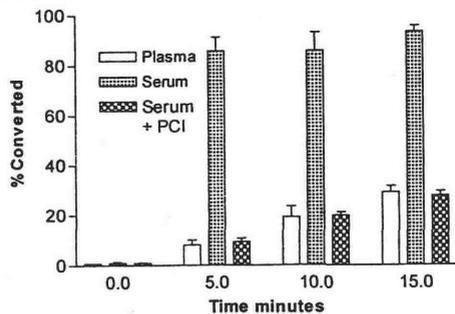
【方法】CPNはPlummerらの方法に準じて精製した。ProCPRはEatonらの方法に準じて精製し、活性化にはthrombin/thrombomodulin複合体を用いた。ペプチドはAMS 422 Multiple Peptide Synthesizerを用いて通常の方法により合成し、逆相HPLCで精製した。C3a octapeptide (C3a-OP)のアミノ酸配列はASHLGLARであり、C5a octapeptide (C5a-OP)のそれはHKDMLQGRである。血漿及び血清によるペプチドの加水分解は以下のごとく行った。血漿にthrombin、thrombomodulin及び塩化カルシウムを添加して10分間室温で反応させた後、thrombinの反応をPPACK (Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone) で止めたものを、ProCPRをCPRに完全に活性化した新鮮血清として用いた。75 ulの血漿あるいは血清と25 ulのペプチドとを37度Cで種々の時間反応させた後、150 ulの5M HClを加えて反応を停止さ

せ、遠心と濾過(0.22 u)により不溶物などを除去してC18カラムでの逆相HPLCでペプチドとその分解量の測定を行った。精製したCPNおよびCPRを用いて活性を測るときには、遠心操作は必要としなかった。

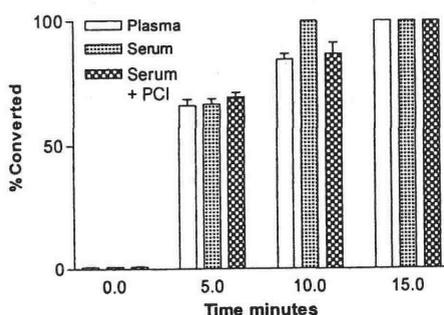
【結果及び考察】血漿と血清とを比較した場合、C3a-OPに対する活性に大きな違いは認めなかったが、C5a-OPに対しては、血清の方が顕著に強力な分解活性を示した。血清にCPRの特異的阻害剤であるPotato carboxypeptidase inhibitor (PCI)を添加しておく、血漿の値に戻ったので、C5a-OPに対する血清中の作用分子の主体は新成されたCPRによるものであることが確かめられた(図1)。精製したCPN及びCPRを用いて行った実験でも、CPNはC3a-OPに対する作用がC5a-OPに対する作用よりも強く、CPRは逆にC5a-OPに対する作用の方が強かった(図2)。

CPNは血漿中に常時活性型で存在する酵素であるので、C3のthioester bondの加水分解で始動されるC3 convertaseで常時生成されるC3aを制御する役割を果たしていると考えられる。これに対し、異物などが存在することにより補体反応が強力に起こってC5 convertaseが形成されたときに生成されるC5aは、炎症反応などで活性化されるCPRが制御する仕組みになっていると考えられる。C5a等によって惹起される炎症反応が起こってから、炎症反応に伴うプロテアーゼで活性化されたCPRがC5aの制御を始める仕組みになっているとすれば、補体活性化に伴う炎症の惹起とその制御の時間差を生ずる仕組みとして好都合である。

(図1) A C5a Octapeptide Hydrolysis

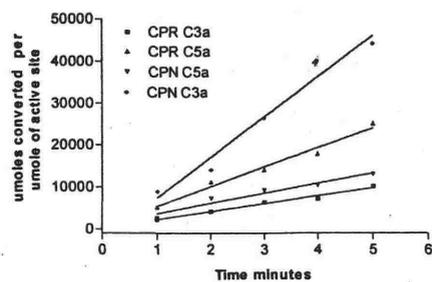


B C3a Octapeptide Hydrolysis

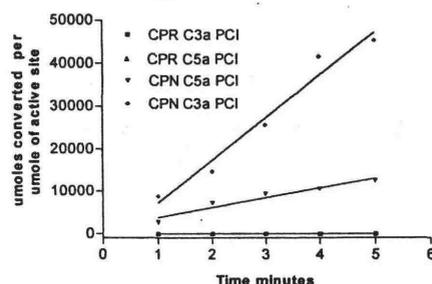


(図2)

A Hydrolysis of C3a and C5a octapeptides with pure CPR and CPN



B Hydrolysis of C3a and C5a octapeptides by pure CPR and CPN with PCI



アニオン性高分子電解質をグラフトした表面の factor D 吸着体としての可能性

村上能庸、北野悦子¹、北村 肇¹、岩田博夫

京都大学再生医科学研究所、¹大阪府立看護大学医療技術短大部

Adsorption of serum factor D by polyanion-grafted beads.

Yoshinobu Murakami, Etsuko Kitano, Hajime Kitamura, Hiroo Iwata

Institute for Frontier Medical Sciences Kyoto University,

¹Department of Clinical Laboratory, Osaka Prefecture College of Health Sciences

【はじめに】慢性腎不全患者の血清では factor D 濃度が著増することが知られている。患者血清中の factor D 濃度の上昇により補体第 2 経路の活性化が起きることが指摘されており、患者血液からの factor D の除去が病態改善に有効であることが報告されている。一方、我々は硫酸エステル基ならびにスルホン酸基を有する高分子電解質表面の factor D 吸着能について報告してきた。今回の報告では、カルボキシル基を有するポリアクリル酸あるいはポリメタクリル酸をポリスチレンビーズ表面にグラフト化し、この表面と血清補体系との相互作用を検討した。

【方法】オゾン前処理したポリスチレンビーズにポリアクリル酸あるいはポリメタクリル酸を表面グラフトした（以後ポリアクリル酸ビーズあるいはポリメタクリル酸ビーズと省略）。所定量のビーズを正常人プール血清(NHS)に添加し、37℃にて 30 分間加温後、遠心分離した上清を試料とした。溶血活性測定法による補体価（CH50 および ACH50）の測定、免疫化学的手法（SDS-PAGE & Immunoblotting および ELISA 法）による補体活性化産物の定量、および血清中の補体タンパク質の

残存量の定性・定量を行った。

【結果および考察】ポリアクリル酸ビーズおよびポリメタクリル酸ビーズの添加により、添加量依存的に ACH50 は減少し、いずれも 10mg/ml の添加時に ACH50 は 0 になった。一方、CH50 に有意の変化は観察されなかった。補体活性化産物（C4d、Bb）の生成量を定量したところ、アクリル酸ビーズおよびポリメタクリル酸ビーズ添加による生成量の増加は認められなかった。このことから、ACH50 の減少は第 2 経路の活性化によるものではないと考えた。試料血清中の補体タンパク質の残存量を測定したところ、アクリル酸ビーズおよびポリメタクリル酸ビーズの添加により補体タンパク質 factor D の減少が認められた。ビーズ添加血清の ACH50 と factor D の残存量を比較したところ、両者の減少傾向はほぼ一致した。十分量の factor D を添加して ACH50 を測定したところ、完全ではないものの ACH50 値の回復がみられた。以上の結果から、アクリル酸ビーズおよびポリメタクリル酸ビーズは、血清補体系を活性化をせず、factor D 以外の補体タンパクの吸着が低いため、補体 factor D 吸着体としての利用の可能性が考えられる。

血清補体価 (CH50) は補体第 2 経路 (AP) 活性化を反映するか？

小林恵美, 北野悦子, 村上能庸¹, 岩田博夫¹, 北村 肇,
大阪府立看護大学医療技術短大部, 京都大学再生医科学研究所¹

Influence of alternative pathway activation on serum CH50 level

Emi Kobayashi, Etsuko Kitano, Yoshinobu Murakami, Hiroo Iwata, Hajime Kitamura,
Department of Clinical Laboratory Science, Osaka Prefecture College of Health Sciences,

¹Institute for Frontier Medical Sciences Kyoto University

I はじめに

血清補体価 (CH50) は, 一般には補体古典経路 (CP) に関わる補体成分の活性を反映していると考えられている。しかし, 1) EA 上にできる C3b によって (B 因子や D 因子が参加して) 同時に第 2 経路 (AP) も活性化される, 2) B 因子, D 因子あるいは P の欠損症患者の血清 CH50 は正常人より低値である¹⁾, 3) Bio-Rex 70 Resin を使って作成した D 因子欠損血清の CH50 は NHS より低値である²⁾, 4) モノクローナル抗 P 抗体を血清に加えて反応させると CP 活性化による sC5b-9 形成が抑えられる³⁾, などの報告があることから, CH50 値は AP 活性化をも反映しているという説が浮上してきた。

そこで, 今回, 新しい方法によって D 因子欠損血清を作成し, その CH50 値を測定することによって CH50 値は AP 活性化を反映するかを調べた。

II 材料及び方法

1. 材料

正常人プール血清 (NHS): ボランティア健常人 14 人より血清を採取し混合後分注し, -80°C で保存した。

試薬および抗体: 以下の試薬, 抗体を使用した。

スルホン酸基を有する Poly(2-acrylamide 2-methylpropane sulfonate) をグラフトしたポリスチレンビーズ (PAMPS-beads)⁴⁾, Bio-Rex 70 Resin (Bio-Rad), Block Ace (大日本製薬), 0.05% Tween20-PBS, コニカイムノステイン HRP-1000 (Konica), ヒツジ抗ヒト D 因子 (THE BINDING SITE), HRP 標識ヤギ抗ヒツジ IgG (DAKO)。

PAMPS-beads 処理血清の作成: 血清 1.0ml に種々の濃度の PAMPS-beads を加え 30°C で 30 分反応させた後, 遠心し PAMPS-beads を除いた上清を採取した。

2. 方法

1) 補体溶血活性測定; マイクロプレート法で CH50 値は EA を, ACH50 値は Erab を用い測定した⁵⁾。

2) Immunoblotting; NHS, 精製補体成分および検体を SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜に転写し間接酵素抗体法にて解析した⁶⁾。

III 結果

I) PAMPS beads 処理による D 因子欠損血清の作成

種々の濃度の PAMPS beads と反応させた NHS (PAMPS beads 処理 NHS) について調べた。

1. ACH50 値は, PAMPS 濃度に応じて低下し,

2.5mg/ml 以上で 0 になった。

2. Immunoblotting で D 因子について調べた。
精製 D 因子と同じ位置にバンドが観察されたが、PAMPS の量が多くなるにつれてバンドが薄くなり、PAMPS 2.5mg 以上では消失した。
3. PAMPS beads 処理 NHS に D 因子を加え ACH50 値を測定したところ、ほぼ完全に値が回復した。

以上より、PAMPS beads 処理 (2.5mg/ml 以上) によって D 因子欠損血清が作成されることが判明した。

II) PAMPS beads 処理による D 因子欠損血清の CH50 値

PAMPS beads 処理 NHS の CH50 値は、処理前の値を 100% とすると、PAMPS beads 量が 2.5mg/ml のとき $102 \pm 11.8\%$ (n=6)、5.0mg/ml のとき $96 \pm 11.6\%$ (n=7) であり、同処理により CH50 値は低下しないと考えられた。

III) D 因子欠損血清の CH50 値への D 因子添加の影響

PAMPS beads 処理 NHS に D 因子を加え CH50 値を測定したところ、D 因子添加前と値は変わらなかった。また、無処理 NHS に D 因子を加えると ACH50 値は上昇するが、CH50 値は変わらなかった。

IV) 個々の健常人血清の PAMPS beads 処理

健常人ボランティア 10 名について各個人の血清から PAMPS beads 処理により D 因子欠損血清を作成し、各々の CH50 値および ACH50 値を測定したところ、いずれの場合も ACH50 値は 0 近くまで低下したが、CH50 値は低下しなかった。

V) Bio-Rex との比較

PAMPS beads の代わりに Bio-Rex を使って D 因子欠損血清を作り、CH50 値、ACH50 値を測定したところ、PAMPS と比べて Bio-Rex は大量に入れても ACH50 値が 0 にならず、一方 CH50 値の低下が見られた。また、Immunoblotting で D 因子の確認を行ったところ、Bio-Rex の濃度が濃くなくても D 因子は残っていた。

IV 考察と結論

血清の PAMPS beads 処理は新しい D 因子欠損血清作製法であることが判明した。

この PAMPS beads 処理して作成した D 因子欠損血清は、NHS から作成した場合も、個々の健常人から作成した場合も、その CH50 値は元の血清の CH50 値と変わらなかった。また、NHS に精製 D 因子を添加すると ACH50 値は上昇するが、CH50 値は変わらなかった。これらのデータは CH50 値は AP 活性化を反映しないことを示すと考えられた。

文献

- 1) PS. Hiemstra *et al.* : J Clin Invest, 84(6) : 1957-1961, 1989
- 2) Y. Zhang *et al.* : Immunopharmacology, 42 : 81-90, 1999
- 3) R. Gupta-Bansal *et al.* : Molecular Immunology, 37 : 191-201, 2000
- 4) Y. Murakami, H *et al.* : Journal of Biomaterials Sciences, in press
- 5) 北村 肇 他 補体測定法, “生物薬科実験講座 10 免疫と生体防御 I” 213-234, 廣川書店, 1997.
- 6) E. Kitano *et al.* : Int Arch Allergy Immunol, 122 : 299-302, 2000

正常ヒト肝細胞による D 因子産生 (第 2 報)

北野悦子, 福森泰雄¹, 北村 肇

大阪府立看護大学医療技術短期大学部, 大阪府赤十字血液センター¹

Synthesis of Complement Factor D by Normal Human Hepatocytes

Etsuko Kitano, Yasuo Fukumori¹, Hajime Kitamura,

Osaka Prefecture College of Health Sciences, Osaka Red Cross Blood Center¹

【はじめに】

昨年われわれは, 正常肝細胞が *in vitro* で D 因子を産生すること^{1,2,3)}, また, その産生量比較から, これまで D 因子を産生しないと考えられてきた肝臓が, 血清中の D 因子の主たる産生臓器である可能性を示唆した^{1,2,3)}。

これまで, D 因子は肝臓では産生されず主として脂肪組織で産生されると考えられてきた。これは, D 因子は脂肪細胞が産生する adipsin と同じであり, その mRNA が肝組織や 肝癌由来培養細胞 HepG2 ではなく, 脂肪組織に多く検出されるという報告⁴⁾による。前回, われわれは正常肝細胞に D 因子 mRNA が存在することを報告した^{2,3)}。今回は, D 因子を産生分泌しない HepG2 にも mRNA が存在することをはじめ細胞が産生する D 因子についていくつかの興味深いデータを得たので報告する。

【材料および方法】

1) 細胞: 正常ヒト肝細胞 (normal human hepatocyte) として Human Primary Hepatocyte Epithelial Cells (Cell Systems), 肝癌由来培養細胞として HepG2 (liver hepatoblastoma, human) (大日本製薬), 胃癌由来培養細胞として KATO-III, MKN-28, MKN-74 (JCRRB) を使用した。

2) 細胞培養: 各細胞を 5% CO₂ / 95% air, 37°C 条件下で 1~3 日間培養し, その細胞培養上清および細

胞を採取し, 被検検体とした。

3) 培養上清中の補体成分定量: サンドイッチ ELISA にて培養上清中の補体成分量を定量した。

4) 培養上清および cell lysate 中の補体成分の解析: 特異抗体を用いた immunoblotting で行った。

5) RT-PCR による細胞内 D 因子 mRNA の解析: 各細胞より mRNA を抽出, 当方作成のプライマー, First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amarsham Farmacia), Ampli Taq polymerase (Perkin Elmer) を用い RT-PCR を行った。PCR 産物の確認は, アガロース電気泳動後 ethidium bromide 染色で行った。

5) PCR 産物より得た DNA の シーケンス: RT-PCR より得た PCR 産物を Full Length Sequencing - Double strand sequence 法- で解析した。

【結果および考察】

1) 細胞の D 因子産生量の定量: 既に報告したように, 正常肝細胞 ($197.50 \pm 32.27/10^6$ cells/3dys) や胃癌由来細胞 (KATO-III ; 2.47 ± 1.34 , MKN-28 ; 0.94 ± 0.49 , MKN-74 ; 2.10 ± 0.59 ng/ 10^6 cells/3dys) の培養上清中に D 因子が検出された。しかし, HepG2 の培養上清中には D 因子は検出されなかった。

2) immunoblotting による解析: 培養上清中に分泌された D 因子は, 明らかな 2 本のバンドを示した。精製 D 因子や血清中の D 因子と同一分子量 24000 付近のものに加え, それより少し大きな分子量のも

のと2本のバンドを形成した。

3) RT-PCR による mRNA の解析：1992年に White らによってされた⁶⁾ D 因子の塩基配列からプライマー (5'-GCAGTTCTGGTCCTCCTAGGAGC-3' および 5'-GCTTGGGTGACCCTGACCTTCAG-3') を設定し RT-PCR を行い、得られた産物をアガロースゲル電気泳動した。その結果、正常肝細胞や KATO-III, MKN-28, MKN-74 だけでなく、培養上清中に D 因子の産生分泌が認められなかった Hep G2 にも同様の 775bp 付近に1本のバンドが検出された。

4) PCR 産物の DNA シーケンス結果：今回、われわれが行った5種の細胞から抽出した D 因子の DNA についてシーケンスを行った結果、5種すべて同一の塩基配列が得られた。それは、1 - 775 番の範囲で1992年 White らによって報告されていた adipsin / factor D 'FD' の DNA 配列 (2000.10.31 現在 NCBI の GenBank に再登録) と4カ所 (55, 133, 134, 135 番) 異なっていた (図 1)。しかし、今回われわれが示した D 因子の塩基配列は、2001.4.16 に NCBI Annotation Project によって新し

く GenBank に登録された 'FD' の塩基配列に一致した。

【結論】

RT-PCR により得られた D 因子の DNA シーケンスの結果は1992年に報告されたものとは異なったが、本年4月新たに報告されたものに一致したことから、D 因子の mRNA が存在しないと従来言われていた肝細胞に、D 因子の mRNA が確認された。

また、D 因子タンパクを産生している正常肝細胞だけでなく、全く D 因子タンパクを産生しない Hep G2 にも同一の D 因子の mRNA が確認された。

【文献】

- 1) Kitano, E. *et al.* Int. Arch. Allergy Immunol., 122:299-302 (2000)
- 2) Kitano, E. *et al.* Immunopharmacology, 49(1-2):43 (2000)
- 3) 北野悦子, 他, 第37回補体シンポジウム抄録集 (2000)
- 4) Barnum, S.R. *et al.* Eur. J. Immunol., 15:1148-1151 (1985)
- 5) Kitano, E. *et al.* Mol. Immunol., 35:363 (1998)
- 6) White, R.T. *et al.* J. Biol. Chem., 267:9210-9213 (1992).

```

1   g c a g t t c t g a   t c c t c c t a g a   a g c g g c c g c c   t g c g c g g c g c   g g c c c c g t g g   t c g g a t c c t g
61  g g c g g c a g a g   a g g c c g a g g c   g c a c g c g c g g   c c c t a c a t g g   c g t c g g t g c a   g c t g a a c g g c
121 g c g c a c c t g t   g c g g c g g c g t   c c t g g t g g c g   g a g c a g t g g g   t g c t g a g c g c   g g c g c a c t g c
181 c t g g a g g a c g   c g g c c g a c g g   g a a g g t g c a g   g t t c t c c t g g   g c g c g c a c t c   c c t g t c g c a g
241 c c g g a g c c c t   c c a a g c g c c t   g t a c g a c g t g   c t c c g c g c a g   t g c c c c a c c c   g g a c a g c c a g
301 c c c g a c a c c a   t e g a c c a c g a   c c t c c t g c t g   c t a c a g c t g t   c g g a g a a g g c   c a c a c t g g g c
361 c c t g c t g t g c   g c c c c c t g c c   c t g g c a g c g c   g t g g a c c g c g   a c g t g g c a c c   g g g a a c t c t c
421 t g c g a c g t g g   c c g g c t g g g g   c a t a g t c a a c   c a c g c g g g c c   g c c g c c c g g a   c a g c c t g c a g
481 c a c g t g c t c t   t g c c a g t g c t   g g a c c g c g c c   a c c t g c a a c c   g g c g c a c g c a   c c a c g a c g g c
541 g c c a t c a c c g   a g c g c t t g a t   g t g c g c g g a g   a g c a a t c g c c   g g g a c a g e t g   c a a g g g t g a c
601 t c c g g g g g c c   c g c t g g t g t g   c g g g g g c g t g   c t c g a g g g c g   t g g t c a c c t c   g g g c t c g c g c
661 g t t t g c g g c a   a c c g c a a g a a   g c c c g g g a t c   t a c a c c c g c g   t g g c g a g c t a   t g c g g c c t g g
721 a t c g a c a g c g   t c c t g g c c t a   g g g t g c c g g g   g c c t g a a a g t   c a g a g t c a c c   c a a g c a a c a a
781 a g t c c c g a g c   a a t g a a g t c a   t c c a c t c c t g   c a t c t g g t t g   g t c t t t a t t g   a g c a c c t a c t
841 a t a t g c a g a a   g g g g a g g c c g   a g g t g g g a g g   a t c a t t g g a t   c t c a g g a g t t   g g a g a t c a g c
901 a t g g g c c a c g   t a g c g c g a c t   c c a t c t c t a c   a a a t a a a t a a   a a a a t t a g c t   g g g c a a t t g g
961 c g g g c a t g g a   g g t g g g t g c t   t g t a g t t c c a   g c t a c t c a g g   a g g c t g a g g t   g g g a g g a t g a
1021 c t t g a a c g c a   g g a g g c t g a g   g c t g c a g t g a   g t t g t g a t t g   c a c c a c t g c c   c t

```

図 1

Glioma cell line, T98G 細胞でのレクチン経路成分 MASP1、-3 および博多抗原の発現・産生

蔵屋幹夫、松下操、遠藤雄一、藤田禎三

福島県立医科大学・医・第二生化学講座

Productive expression of mannose binding lectin-associated serine protease-1, -3, and hakata antigen by human glioma line, T98G cells

Mikio Kuraya, Misao Matsushita, Yuichi Endo, and Teizo Fujita

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

(はじめに)

補体レクチン経路が自然免疫の重要な一翼を担うことが明らかとなって来ている。我々は、局所でのレクチン経路の寄与を考察するために、種々の細胞株での補体レクチン経路(LCP)成分の発現を検討し、Glioma 細胞株 T98G において、MASP-1, MASP-3¹⁾および博多抗原(HA)が産生されることを見出した。

(方法)

- 1) RT-PCR 法を用い、種々の細胞株での MASP-1, -2, -3, MBL, ficolin/P35, ficolin/P35-related, HA, C1-9 mRNA s 発現を調べた。
- 2) ELISA 法を用いて、MASP-1/-3 の産生を調べた。
- 3) T98G 細胞培養液より、1E2-sepharose カラム

を用いて、MASP-1/-3 を抽出した。

- 4) 1E2-Sepharose カラム吸着画分の MASP-1/-3 を同定するために、それぞれ特異抗体を用いた Western blotting を行った。また、同様に、C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, HA についても、Western blotting を行った。

(結果)

- 1) LCP のレクチン (MBL, P35, P35-related, HA)mRNAs は 様々な細胞に渡って、広範に発現が認められた。その発現レベルは細胞によって様々であった。T98G では、HA が比較的、高発現であった。
- 2) MASP1, 2, 3 mRNAs の発現は non-lymphoid, non-myeloid 細胞株で発現している傾向にあった(T98G, TKB-1, HepG2, HeLa)。

- 3) MASP-1,-3 を高発現している T98G 細胞培養液より、1 E2-Sepharose カラムを用いて、MASP-1/-3 を抽出した。
- 4) 抽出 MASP-1/-3 画分は 1 E2、および anti-MASP-3 で免疫染色された。また、そのサイズは MASP-1、および MASP-3 がそれぞれ、81kDa と 107kDa に概算された。
- 5) T98G において HA に加え、C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6 mRNAs の検出された。Western blotting により、これらタンパク質の分泌も確認された。

(考察)

T98G 細胞において、LCP 成分および補体の early components が産生されていることが判明した。Cerebrospinal fluid 中に late components が存在することが知られていることを考え合わせると、局所、即ち、脳内で産生された LCP 成分により、補体の活性化を経て、異物等の除去が生じると推測される。また、T98G 細胞は脳星状細胞でのレクチン成分産生を検討する上で、良いモデルと思われる。

(文献)

- 1) Dahl, M.R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A.C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T., and Jensenius, J.C.

シンポジウム抄録

食細胞系を基盤として進む T, B リンパ球の分化

京大・再生研・免疫

河本 宏

造血幹細胞から T 系列, B 系列, myeloid 系列への分化決定を明らかにするためには, これらの系列への分化を同時に解析できるクローナルアッセイが必要である. そのような試みは, われわれが数年前に開発した T, B および myeloid 系への分化能を同時に調べられる multilineage progenitor (MLP) アッセイが最初である¹⁾. 現在ではこの方法に改良を加えてナチュラルキラー (NK) 細胞系列や赤血球系列をも含めて解析できるようになっている. これらのクローナルアッセイを用いて主にマウス胎生期の前駆細胞を調べ, 造血幹細胞から T 細胞へ至る経路をほぼ明らかにすることができた¹⁾⁷⁾.

造血幹細胞からの最初の分岐により, myelo-lymphoid 系前駆細胞 (p-MTB) と myelo-erythroid 系前駆細胞 (p-ME) がつくられる. リンパ球系列への最初の一步を進めた p-MTB は, myeloid/T 前駆細胞 (p-MT) と myeloid/B 前駆細胞 (p-MB) という中間段階を経て, それぞれ T 系列前駆細胞 (p-T), B 系列前駆細胞 (p-B) へと決定される. このように, erythroid, T, B 系列への分岐のそれぞれに, 途中まで myeloid 系列への分化能が保持されている. この系列決定モデルの特徴は, myeloid 系への分化プログラムが基本プログラムとして erythroid, T, B といった特殊化した系列の土台になっている点である. このことは, 系統発生的により古いミエロイド系列から erythroid, T, B という系列が進化してきたことを表していると考えることができる. このモデルは, p-ME と p-TB に分岐するという従来のモデルでは説明が困難であったいくつかの実験結果に対して, 整合性のある解釈を導くことができる. 例えば, B/macrophage 間の類似性および分化転換, M/T, M/B 型の混合型白血病の存在, 転写因子 PU.1 の KO マウス (B と macrophage の完全欠損) や Pax5 KO マウス (B 系列への分化停止による T, myeloid 分化能の獲得), T 系列樹状細胞の存在などの説明が容易になる. また, このような系列決定の経路が描

けるようになったことで, 造血系においていまなお広く信じられている stochastic model (random restriction model) はもはや無意味になったといえよう.

興味深いことに, 多くの人が漫然と p-TB の存在を信じている T 系列と B 系列のみをつくるはずの p-TB (common lymphoid progenitor) はどの分画にも検出されなかった. T 細胞と B 細胞は形状の類似性もさることながら, 抗原レセプターの再構成という非常に高度に進化した機能を共有していることなどから, 先験的に両者に共通の前駆細胞が存在すると思われる傾向が強かった. しかし, p-TB が存在することを示した論文は, Weissman らのグループによるものが 1 つあるだけである⁸⁾. 彼らは, 成獣マウス骨髄中に p-TB を含む分画を同定したというが, 検出法に問題があるだけでなく, その分画中の p-TB の頻度がきちんと測定されているわけではない. また, p-MT や p-MB などの存否は調べられていないので, p-TB が主要な経路であるかどうかは明らかでない. われわれの示した知見と Weissman らの主張の違いが, 胎生期と成獣期との差として解釈される傾向があるが, そのような大きな差が胎生期と成獣期の間にあるとは考えにくい. また, p-TB という段階がほんのわずかの間でも存在するかどうかという議論は必ずしも建設的ではなからう. p-TB が存在することを前提としたモデルに基づいて思考することは, 造血系の個体発生的な成立を理解することの助けにならないばかりか, 妨げにさえなるのではないかと考えている.

【文献】

- 1) Kawamoto, H. et al. *Int Immunol*, 9: 1011, (1997)
- 2) Kawamoto, H. et al. *J Immunol*, 161: 3799, (1998)
- 3) Ikawa, T. et al. *J Exp Med*, 190: 1617, (1999)
- 4) Kawamoto, H. et al. *J Immunol*, 162: 2725, (1999)
- 5) Kawamoto, H. et al. *Immunity*, 12: 441, (2000)
- 6) Ohmura, K. et al. *J Immunol*, 166: 3290, (2001)
- 7) Katsura, Y. et al. *Int Rev Immunol*, 20: 1, (2001)
- 8) Kondo, M. et al. *Cell*, 91: 661, (1997)

Toll Like Receptor と自然免疫

松口徹也
名古屋大学・医・生体防御

Toll-like receptor and Innate Immunity
Tetsuya Matsuguchi
Laboratory of Host Defense and Germfree Life, Nagoya University School of Medicine

<目的>

Toll-Like Receptor (TLR)は病原菌の PAMP (pathogen-associated molecular pattern) を認識し、NF- κ B、MAP キナーゼ経路を活性化し、ひいてはサイトカイン・ケモカイン産生、抗原提示能の亢進を誘導する。よって TLR は、自然免疫担当細胞の病原体処理能を調節するのみでなく、後に続く獲得免疫反応の程度を規定する極めて重要な蛋白群であり、その下流シグナルの活性化は厳重に制御される必要がある。TLR ファミリーのうち TLR 4 は LPS のレセプターとして働く。TLR4 からの下流シグナル伝達には MyD88 が重要な役割を果たすが、MyD88 ノックアウトマウスにおいても LPS 刺激による下流シグナルの活性化がおこることが報告されている。今回、我々は TLR4 の下流シグナルに関わる蛋白の同定とその機能解析を目的として以下の実験をおこなった。

<方法>

- 1) マウス TLR4 細胞内ドメインをベイトとした Yeast Two Hybrid 法にてマウス胎仔 RNA より作成された cDNA ライブラリをスクリーニングした。
- 2) マウス MKP-1 cDNA をプローブとしてマクロファージに発現する新たな MAP キナーゼフォスファターゼの同定を試みた。

<結果>

1) TLR4 細胞内ドメインと特異的に結合する複数個の cDNA クローンを得た。そのうち 2 つは MyD88 であり、残りのうち 2 つは JIP3 (JNK interacting protein 3) といわれる JNK 結合性 scaffold protein であった。293T 細胞への共発現系において JIP3 は TLR4 細胞内ドメインと結合した。また、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞で JIP3 を強発現させると LPS 刺激による JNK 活性化が著明に増強されたが、p38 キナーゼの活性化には影響を与えなかった。

2) 新規に MKP cDNA をクローニングし、MKP-M (MAP kinase phosphatase isolated from macrophages) と命名した。MKP-M は MAP キナーゼのうち JNK を特異的に脱リン酸化し、マクロファージで LPS によって誘導され、LPS による JNK 活性化、TNF α 産生を負に制御する役割を果たしていた。

<考察> LPS による JNK 活性化シグナル伝達経路の新たな制御蛋白として JIP3、MKP-M の 2 つを同定した。

<文献>

- 1) Matsuguchi T. et al., Mol. Cell. Biol. (in press)
- 2) Matsuguchi T. et al., J. Immunol., 165: 5767 (2000)
- 3) Matsuguchi T. et al., Blood 95: 1378 (2000)

ナチュラルキラー細胞の多様性と機能

反町 典子

東医歯大・院・感染分子

ナチュラルキラー(NK)細胞は、事前の抗原感作を必要とせずに標的細胞を殺傷することのできるリンパ球である。NK細胞を選択的に欠損するマウスは、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞を排除できないこと、末梢のNK細胞による細胞傷害活性が低いヒト集団では、有意に発がん率が上昇すること、などの知見は、NK細胞がウイルス感染細胞や腫瘍細胞を生体から排除するための直接のエフェクター細胞であり、生体防御反応に重要な役割を果たしていることを示している。

T細胞レセプターもB細胞レセプターも発現しないNK細胞が、どのように殺傷すべき標的細胞を識別するかは、長い間明らかではなかったが、近年NKレセプターの検索、同定が精力的に進められ、NK細胞の標的認識に関わるレセプター群が次々と同定されてきた。その結果NK細胞は、活性化レセプターと抑制性レセプターという、機能的に相反する2種類のレセプターを用いて標的を識別し、この2種類のレセプターから伝達されるシグナルのバランスによって細胞傷害活性が調節されていることが明らかになってきた。

私たちはこれまで、マウスNK細胞の標的認識に関わる新規分子を検索する目的で、NK細胞表面分子に対する種々のモノクローナル抗体を作製し、抗原の同定、NK細胞傷害活性及び分化における機能解析を行ってきた。

得られた抗NKレセプター抗体を含めて、種々のNK細胞表面上の機能分子に対する抗体を用いた解析の結果、生体内のNK細胞は実に多様なサブセットに分類できること、多様なNK細胞サブセットは、発現するレセプターの種類によって機能分担を行い、複数発現するNKレセプターは独立に機能することが明らかになってきた。

本シンポジウムでは、抑制性NKレセプターの一つであるCD94/NKG2Aに関する私たちの最近の知見を紹介し、複数発現するNKレセプターの機能的独立性と、NK細胞の自己寛容においてCD94/NKG2Aが果たす役割について考察する。CD94/NKG2Aは、非古典的MHC class IであるQa-1をリガンドとして、NK細胞上の抑制性レセプターとして機能する。Qa-1は古典的MHC class Iのリーダーペプチドを提示するという性質を有し、それ故にCD94/NKG2AとQa-1の相互作用は、NK細胞のユニークな免疫監視機構を担っている。ヒトで得られた興味深い知見も併せて、NK細胞の免疫監視におけるCD94の機能を紹介したい。また、NK細胞の多様な機能的サブセットが、発生過程や外来刺激存在下でどう変動するのかを示し、その変動はNK細胞による生体防御反応にどのような意義を持つのかについて考察したい。

T細胞機能の多様性と調節

◎高山英次¹ 大川貴司² 古池雄治² 多田隈卓史¹ 平出星夫³ 関修司⁴
防衛医大¹ 寄生虫学² 小児科学² 外傷研究² 微生物学

免疫応答に重要な役割を担う T 細胞は産生するサイトカインにより Th1 細胞と Th2 細胞に大別される。Th1 細胞により誘導される免疫応答はインターフェロン(IFN)- γ 等の産生を介して細胞性免疫を誘導し、細胞内感染病原体の排除や腫瘍細胞傷害などの免疫反応に重要である。一方、Th2 細胞により誘導される免疫応答はインターロイキン(IL)-4等の産生を介して液性免疫を誘導し、細胞外感染病原体の排除などの免疫反応にはたらく。Th1/Th2 細胞により誘導される免疫応答は相互に抑制しあいながら生体防御において重要な役割を担っているが、このバランスの崩れは免疫性疾患を引き起こす原因となる。近年、マウスおよびヒトのナチュラルキラー(NK)細胞マーカーを持つ T 細胞サブセットの解析が進められ、Th1/Th2 細胞による免疫応答バランスの調節には、胸腺外で分化するこれら NK 細胞マーカーを持つ T 細胞サブセットが重要な役割を担うことが明らかとされつつある。

マウスにおいて、胸腺分化 T 細胞に比べ T 細胞受容体(TCR)の発現が低い(intermediate) 胸腺外分化 CD8⁺CD122⁺細胞が存在するが、この CD8⁺CD122⁺TCR^{int}細胞は、通常の T 細胞に比べより早期に反応し強い IFN- γ 産生能を示し、さらに CD4⁺T 細胞の IFN- γ 産生をも促すことができる。また、マウスの IFN- γ 産生能は老化に伴って増加するが、CD8⁺CD122⁺TCR^{int}細胞の割合もまた老化に伴って増加する。一方、ヒトにおいてもまた、NK 細胞マーカーである CD57 を発現する

CD8⁺T 細胞が存在するが、このヒト CD57⁺CD8⁺T 細胞の TCR の発現は intermediate であり胸腺外分化 T 細胞であると考えられる。そして、この CD57⁺CD8⁺TCR^{int}細胞は強い IFN- γ 産生能を示し、老化に伴い末血中での割合は増加する。さらに、通常の T 細胞集団の発現する TCR 遺伝子は多様であるのに対し、CD57⁺CD8⁺TCR^{int}細胞群の発現する TCR 遺伝子には多様性が認められず、すなわちオリゴクローナルに増殖する。

ところで、マウス CD8⁺CD122⁺TCR^{int}細胞とヒト CD57⁺CD8⁺TCR^{int}細胞は、TCR を介した刺激が無くても、マクロファージ等によって産生される IL-12 と IL-15 によっても活性化され、NK 活性と抗腫瘍サイトカインである IFN- γ の産生能を強く発現する。さらに、サイトカインにより活性化された CD57⁺CD8⁺TCR^{int}細胞はヒト血管内皮細胞にも細胞傷害活性を発現する。また、骨髄移植に伴う急性の graft-versus-host disease (GVHD)の発症に骨髄提供者の CD57⁺T 細胞の増殖が伴うことも報告されている。

これらのことは、マウス CD8⁺CD122⁺TCR^{int}細胞とヒト CD57⁺CD8⁺TCR^{int}細胞がマウスおよびヒトそれぞれの免疫系において類似した役割を担っていること、そして Th1 細胞により誘導される免疫応答に重要な役割を担っていること、さらに老化に伴う免疫能の変化や感染防御に深く関与する一方で GVHD や自己免疫疾患などにおける臓器障害にも関与するなど両刃の剣となりうることを示している。

CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞による免疫自己寛容の維持機構及びその操作による自己免疫、腫瘍免疫の誘導

坂口志文（京大・再生研）

正常個体中には自己成分を反応する自己反応性 T 細胞が存在し、その活性化は自己免疫病の発症につながる。担癌個体において、自己リンパ球が認識する自家腫瘍抗原の多くが正常自己抗原であり、腫瘍免疫の一部は自己免疫と捉えることができる。従って自己免疫を誘導するような免疫系の操作は、同時に自家腫瘍に対する免疫応答を惹起できる可能性がある。例えば、免疫自己寛容の維持、即ち自己免疫の阻止には制御性 T 細胞が関与しており、そのような制御性 T 細胞は、自家腫瘍に対する有効な腫瘍免疫の成立に抑制的に働いている可能性がある。

正常動物末梢 CD4⁺T 細胞の約 5-10% を占める CD25⁺T 細胞を除去すれば、様々な自己免疫病が自然発症してくる。正常 CD25⁺T 細胞を補えば発症を阻止できる。このような CD25⁺CD4⁺T 細胞は試験管内抗原刺激に不応答（即ちアナジー）であるが、他の T 細胞野活性化・増殖を強く抑制する。また、CTLA-4 分子を構成的に発現する。CD25⁺CD4⁺T 細胞上の CTLA-4 分子のブロックは抑制を解除する。また、我々の新しく見出した DTA-1 分子は CD25⁺CD4⁺T 細胞上にのみ高発現しており、同分子のライゲーシオンによるシグナルは CD25⁺T

細胞による抑制を解除する。生体内では、CD25⁺CD4⁺T 細胞上の CTLA-4 分子のブロック、また DTA-1 分子を発現する T 細胞の除去により自己免疫病を誘導できる。

以上の知見は、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の除去、あるいはその機能の操作により自家腫瘍に対して有効な免疫応答を誘導できる可能性を意味する。実際、致死量の腫瘍細胞を同系マウスに接種した場合、抗 CD25 抗体の投与による CD25⁺T 細胞の除去、抗 CTLA-4 抗体投与による CD25⁺T 細胞上の CTLA-4 分子のブロック、あるいは抗 DTA-1 抗体投与による抑制解除により、腫瘍を退縮・拒絶に導くことができる。CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞を除去した場合、まず NK 細胞様の腫瘍抗原非特異的免疫応答が惹起される。その後に腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が出現し、腫瘍特異的な拒絶に到る。

本シンポジウムでは、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の免疫学的特性、その免疫寛容維持機能の分子的基础、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の除去あるいはその発現する機能分子の操作による自己免疫あるいは腫瘍免疫の誘導機序について述べる。

カブトガニにおける異物認識の分子基盤

川畑俊一郎

九州大学大学院・理学研究院・生物科学部門

Molecular basis of the recognition of non-self substances in horseshoe crabs

Shun-ichiro Kawabata

Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University

無脊椎動物においては、抗体産生系の欠除のために生体防御レクチンや抗菌物質、フェノールオキシダーゼ系を中心とする自然免疫が感染防御の主役である。カブトガニの体液中の血球のほとんどは顆粒細胞で占められ、細胞内の大、小2つの顆粒には、体液凝固因子、プロテアーゼインヒビター、レクチン、抗菌物質などの生体防御関連因子が選択的に貯蔵されている。その顆粒細胞は、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS) に鋭敏に反応して顆粒成分を細胞外へ分泌し、一連の生体防御反応を引き起こす。

自然免疫の異物認識における標的は、感染微生物に存在する特有の分子パターンとされる。私達は、現在までに顆粒細胞から4種、血漿から2種の生体防御レクチンを精製した。タキレクチン-1は、リピドAと2-ケト-3-デオキシオクトン酸から成るLPSに共通した構造要素を認識する。タキレクチン-2は、生物に普遍的にみられるD-GlcNAcやD-GalNAcを認識し、タキレクチン-5は、さらに構造的に単純なアセチル基を標的としている。一方で、タキレクチン-3やタキレクチン-4は、特定のグラム陰性菌のO-抗原に見られる糖や糖鎖構造を特異的に識別することができる。これらの限られた種類のレクチンが、他の生体防御因子との共同作用により多種多様の微生物に対して感染防御の最前線で機能している(1-3)。最近になっ

て、カブトガニのN-アセチルグルコサミン認識レクチンのX線結晶構造が完成し、非自己認識におけるパターン認識の一端が明らかにされた(4)。

また、カブトガニの自然免疫で活躍する抗菌蛋白質は、アミノ酸配列や抗菌スペクトラムは異なっているが、すべてキチン結合活性を示す。それらの抗菌蛋白質の立体構造が判明するにつれて、キチン結合の構造モチーフが浮かび上がってきた(5,6)。基本的には、逆平行 β -シートの片面に集中する芳香族アミノ酸や疎水性の側鎖がキチン結合に直接関与していると考えられる。興味深いことに、抗菌活性とキチン結合活性とは相関がなく、抗菌蛋白質が未知の生理機能を担っていることが推測される。最近、これらの抗菌蛋白質が体液中のヘモシアニンと結合し、フェノール酸化酵素活性を誘導することが判明した(7,8)。

(文献)

- 1) Saito, T. *et al. J. Biol. Chem.* **272**, 30703 (1997)
- 2) Gokudan, S. *et al. PNAS USA* **96**, 10086 (1999)
- 3) Inamori, K. *et al. J. Biol. Chem.* **274**, 3272 (1999)
- 4) Beisel, H.-G. *et al. EMBO. J.* **18**, 2313 (1999)
- 5) Osaki, T. *et al. J. Biol. Chem.* **274**, 26172 (1999)
- 6) Suetake, T. *et al. J. Biol. Chem.* **275**, 17929 (2000)
- 7) Nagai, T. *et al. J. Biol. Chem.* **275**, 29267 (2000)
- 8) Nagai, T. *et al. J. Biol. Chem.* **276** in press (2001)

ショウジョウバエの自然免疫系を制御する パターン認識分子

倉田 祥一郎
東北大学大学院薬学研究科

A pattern recognition receptor in *Drosophila* innate immune response
Shoichiro Kurata
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

獲得免疫を有さない昆虫は、菌の感染に対して自然免疫だけで生体防御を行う。昆虫の自然免疫は、細胞性の反応と、体液性の反応に大別できる。体液性の反応は、すでに体液中に存在している因子による一次反応と、新たな遺伝子発現を必要とする二次反応からなる。一次反応としては、プロフェノールオキシダーゼ (proPO) カスケードが知られており、二次反応では、殺菌活性を有する抗菌ペプチドなどの産生誘導が挙げられる。近年、ショウジョウバエの抗真菌ペプチド Drosomycin の産生誘導に必須な Toll シグナリングに類似した TLR シグナリングが、哺乳動物の自然免疫においても必須であり、さらに獲得免疫の成立に重要であることが示された。ショウジョウバエでは、Toll のリガンドは spätzle であり、Toll はパターン認識分子として機能しない。spätzle は感染時に活性化されるセリンプロテアーゼカスケードにより pro-spätzle から生じると考えられており、セリンプロテアーゼからなる proPO カスケードとの関連が指摘されている¹⁾。本合同学会集では、ショウジョウバエのゲノム機能を利用した新たな機能獲得型変異体のスクリーニングにより同定した分子につ

いて述べる。この分子は、カイコのペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP)²⁾ と相同性を示したことからパターン認識分子であると考えられた。この分子により、proPO カスケードが活性化され、さらに Diptericin などの抗菌ペプチドの産生が誘導された。したがって、PGRP は体液性反応の一次反応と二次反応を共に制御しうる昆虫自然免疫活性化の鍵を担うパターン認識分子であると考えられる。PGRP に相同性を示す遺伝子は、ショウジョウバエゲノムに 13 存在しており³⁾、ショウジョウバエは、侵入する異物の多様性に複数の PGRP を用意し対応しているものと考えられる。さらに、PGRP に相同性を示す遺伝子は、マウスとヒトのゲノムにも存在する⁴⁾ ことから、PGRP が種を越えて自然免疫に関与している可能性が考えられる。

- 1) Levashina E. et al., *Science* 285: 1917 (1999)
- 2) Ochiai M. et al., *J. Biol. Chem.*, 274: 11854 (1999)
- 3) Werner T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 13772 (2000)
- 4) Kang D. et al., *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 95: 10078 (1998)

ゲノム科学の視点からみた免疫系

笠原 正典

総合研究大学院大学・先導研・生命体科学専攻

The immune system viewed from the perspective of genome science

Masanori Kasahara

Department of Biosystems Science, School of Advanced Sciences,

The Graduate University for Advanced Studies

ヒトのゲノムを詳細に観察すると、ブロック重複によって形成されたと考えられる遺伝子の集団（クラスター）が2-4セット、典型的には4セット、異なった染色体上に存在する現象が認められる。この現象は、ゲノムパラロジ（genome paralogy）として知られている¹⁻³。

ゲノムパラロジを示す遺伝領域としては、Hox 遺伝子クラスターが名高いが、ゲノムパラロジという現象自体はヒトゲノムにおいてかなり高頻度に認められるものである。たとえば、最近、ヒトゲノムのドラフト配列を決定した Venter ら⁴は、1077個にもおよぶ領域が異なった染色体間でのブロック重複によって形成されたと推測されると述べている。

ここでは、ゲノムパラロジを示す遺伝領域のうち、免疫学的に重要な遺伝子がマッピングされているものをいくつかとりあげ、ゲノムパラロジという視点から免疫系を眺めることの有用性^{5,6}について論じたい。

〈参考文献〉

- 1) Lundin LG., *Genomics*, 16:1 (1993)
- 2) Spring J., *FEBS Lett.*, 400:2 (1997)
- 3) Ohno S., *Semin. Cell Dev. Biol.*, 10:517 (1999)
- 4) Venter J.C. et al., *Science*, 291:1304 (2001)
- 5) Kasahara M. et al., *Trends Genet.*, 13:90 (1997)
- 6) Kasahara M., *Immunol. Rev.*, 166:159 (1998)

補体研究会

補体研究会（補体シンポジウム）会則

I 総則

(1) 本会は補体研究会（The Japanese Association for Complement Research）という。

(2) 本会は補体研究会ならびにこれに関連する分野の進歩発展を図ることを目的とする。

(3) 本会は前条の目的を達成するため、次に定める事業を行う。

- 1) 年1回以上にわたる総会ならびに学術集会（補体シンポジウム）の開催。
- 2) 内外の関連学術団体との連絡及び協力。
- 3) その他の必要な事業

II 会員

(4) 本会は、補体研究ならびにこれに関連する分野の学問の研究を志す人々、及びそれに賛同する賛助会員を以て組織される。

(5) 本会に会員として入会を希望する者は、所定の申込書に必要事項を記入し、会費を添えて本会事務局に提出するものとする。

(6) 本会の会費については細則で定める。

(7) 会員は学術集会に於て、その実績を発表できると共に、その抄録集の配布を受ける。

(8) 会員で故なくして2年間会費を滞納したものは退会とみなす。

(9) 本会の名誉を著しく毀損した会員は、運営委員会の議を経て除名することが出来る。

(10) 本会に特に功勞のあった方で、細則に定める規定により推薦された方を名誉会員とする。

III 役員

(11) 本会に次の役員をおく。

会長 1名

運営委員 若干名

監事 2名

補体シンポジウム当期および次期集会長 2名

(12) 会長は、本会を代表し、運営委員会を召集する。会長の選出は運営委員会が行い、総会での承認を得て決定する。任期は4年とし、2期を限度とする。ただし再任後の任期は2年とする。

(13) 運営委員は会員から選挙により選出し、任期は4年とし連続の再任は認めない。細則で定めるところの選挙規定に従って2年毎に選挙を行い、半数ずつ交代するものとする。

(14) 監事は、運営委員経験者の中から運営委員会が選出し、総会での承認を得て決定する。

(15) 監事は会計および選挙等を監査する。監事の任期は4年とし、連続の再任は認めない。任期中監事を辞退するものが生じた際には、所定の手続きを経て速やかに後任を補充するものとし、その際の任期は前任者の残留期間とする。

(16) 運営委員会の構成員は運営委員、補体シンポジウム集会長（当期および次期）および会長とする。

(17) 運営委員会は、構成員の過半数の出席を要する。

(18) 運営委員会は、会務の審議、本会の運営に当たる。

(19) 補体シンポジウムの集会長は、運営委員会が選出決定する。

(20) 補体シンポジウム集会長は、補体シンポジウムを主宰する。

(21) 補体シンポジウム集会長の任期は、前期補体シンポジウム開催時に始まり、主宰補体シンポジウム終了時に終る。

IV 学術集会・総会

(22) 年次集会（補体シンポジウム）を行う。時宜に応じて必要な集会を開催することが出来る。

(23) 運営委員会は、補体シンポジウム開催中または必要に応じて会長がこれを召集する。

(24) 総会は年1回、補体シンポジウム開催中に当期集会長が召集し、運営委員会決定事項の報告と必要な討議を行い、承認を求める。

V 会計

(25) 経理会計は事務局において行うほか、必要に応じてシンポジウム集会長もこれにたずさわる。

(26) 本会の経費は、会費・寄付金・その他の収入および利子をもってこれに

あてる。

(27) 補体シンポジウムにおいては、出席会員から参加費を徴収することが出来る。

(28) 本会の会計年度は1月1日に始まり、12月31日に終わり、総会において会計報告を行う。

(29) 監事は会計の監査を行い、その結果を総会において報告する。

VI 会則変更

(30) 本会の会則を変更する場合は、総会出席会員の3分の2以上の賛成を必要とする。

付則

この会則は昭和60年3月1日より施行する。

平成2年8月7日 一部改訂

平成4年7月23日 一部改訂

平成5年7月21日 一部改訂

細 則

I 会費

(1) 本会の年会費は当分の間年額5,000円とする。但し学生会員（学部学生および大学院生）は3,000円とする。学生会員は、学生証の写し等を毎年事務局へ提出し、確認を受けるものとする。賛助会員の会費は年間1口30,000円とする。

II 選挙規定

運営委員の選出は当分の間次の規定に従って行う。

(2) 運営委員の定数は6名を原則とする。

(3) 選挙事務は事務局において行う。

(4) 運営委員の選挙にあたり、運営委員候補者名簿を作成する。

(5) 運営委員候補者として、任期満了の運営委員は3名、運営委員経験者は1名を推薦することが出来る。

(6) 事務局は、運営委員候補者名簿および投票用紙を、会員に総会開催2ヶ月前までに郵送し、会員はそれにもとづき、所定の日時まで3名連記で投票を行う。ただし、候補者以外のものに投票しても差し支えない。

(7) 開票には、少なくとも監事1名の立会いを必要とする。監事は、開票結果にもとづいて、得票数の上位3名の運営委員と次点1名を定め、運営委員会および総会に報告する。

(8) 次点者は運営委員に欠損が生じた場合に、その任に当たる。

III 事務局

(9) 本会の事務局は会長の指名する事務局長のもとに置く。

IV 名誉会員

(10) 名誉会員の候補者の推薦は、運営委員2名以上の推薦によって成立する。名誉会員候補者は運営委員会において選考され、総会の承認を得て名誉会員に決定される。

付則

細則（1）は昭和62年度より、賛助会員については平成5年度より施行する。

平成2年8月7日 一部改訂

平成4年7月23日 一部改訂

平成5年7月21日 一部改訂

補体研究会賛助会員

(50音順)

エーザイ (株)
(株) 三和科学研究所
トーアエイヨー (株)
日本ハム (株)
明治製菓 (株)
和光純薬工業 (株)

補体研究会

会長	藤田禎三
運営委員	岡田秀親 瀬谷 司 野中 勝 岡田則子 北村 肇 木下夕口ウ
監事	天野哲基 大井洋之
事務局長	松下 操
集会長	藤田禎三
次期集会長	大井洋之

日本生体防御学会

生体防御学会設立の趣旨

生物は外来性の異物や自己成分の一部を適切に処理して、個体の独立性、恒常性を維持する生体防御機構を備えている。この防御機構を生命体の種を超えて把握するため、生体防御学会を設立する。

平成2年2月3日

研究対象

本学会では研究対象として下等生物からヒトに至る生体防御系を広く取り上げる。また防御因子としては、凝集素群、殺菌性・殺ウイルス性などの活性因子、原始的ならびに分化の進んだ食細胞系細胞、原始的免疫現象などが主な研究対象となる。リンパ球による抗原特異的免疫現象は脊椎動物防御系の一つの因子としてこれに含む。

予想される効果とその成果の活用

進化の段階での種々の生命体について各防御因子の研究が進み、その役割と位置が明らかになると共に、それぞれの要素が発展していく様相を把握できる。また生命体個体における防御因子の受け渡しの時間的経過と進化によって獲得した要素の関係が体系的に理解できる。寄生体や体内外異物の処理機構とその限界が明らかになる。

これらの成果によりヒトの疾患の治療、予防、健康の維持について新しい局面が開かれることが期待される。またバイオインダストリーを含む畜産学、水産学などの高い生産性の維持に多大の影響があるものと予測される。

研究領域

【個体レベルでの研究】

系統発生各段階における各動物種に見られる生体防御系の特性
各防御因子の役割とその重要性の度合、各防御因子の時間的受け渡し
個体発生における防御系の発達、その系統発生との関係

外来性異物（寄生体、化学物質など）の処理機構

自己成分（老廃成分、損傷細胞、不要活性物質、変態前組織など）の処理機構

外的環境（放射線、光、温度、酸素などの物理化学的要因、ストレスなど）による自己変性とその修復

寄生体などのエスケープ機序

【器官レベルでの研究】

生体防御系のネットワーク（単核食細胞、リンパ系、未発達のもの）の解析、その相互作用および調節（情報伝達、増幅、制御）系統発生・個体発生における発達の様相
環境とネットワーク

↓↑

【細胞レベルでの研究】

防御系細胞の異物・変性自己成分の識別
受容体、情報伝達、応答、異物排除機構、各細胞間の相互作用
メディエーターとその受容体、情報伝達応答、体液性防御因子との関わり
これらの個体発生、系統発生、寄生体のエスケープ機序

↓↑

【分子レベルでの解析】

細胞レベルでの問題の無細胞系での解析（例えば、防御に関する受容体、情報伝達、応答、損傷とその修復など）
遺伝子レベルでの解析、人工生産

【集団レベルでの研究】

疾患の予防、健康維持 集団での健全さの維持
生体防御機構異常の遺伝学的把握 その制御

↓↑

【生態学的レベルの研究】

動物種間の相互関係（共存と排除）
環境変化と生体防御
生体防御の比較生物学

日本生体防御学会会則

第1章 総則

第1条 本学会は日本生体防御学会 (Japanese Society for Bio-Defence Research; JSBDR)と称する。

第2条 本学会は生体防御学会およびその関連分野の進歩発展を図ることを目的とする。

第3条 本学会の目的を達成するために、次の事業を行う。

- 1 学術集会ならびに総会の定期的開催
- 2 シンポジウムやセミナーの開催
- 3 国内外の諸学術団体との連絡および協力活動
- 4 その他必要な事業

第2章 会員

第4条 本学会は正会員および賛助会員をもって組織する。

正会員は、生体防御研究に関連する領域の研究者またはこれに学問的関心を有するもの、賛助会員は本会の目的に賛同し、その事業を援助しようとする個人または団体を、その資格要件とする。

第5条 正会員および賛助会員になろうとする者は、入会金ならびに当該年度の会費を添えて事務局に申し込むものとする。

第6条 入会金、正会員会費、賛助会員会費の額は別途定める。年会費は毎年12月末日までに翌年度分を納入することとする。

第3章 役員

第7条 本学会に次の役員をおく。

会長	1名
理事	運営委員数の概ね2割
運営委員	正会員数の1割以内
監事	2名

第8条 会長は、理事会により推薦された候補者のうちから正会員の投票により選出する。理事および監事は、運営委員のうちから運営委員の投票により選出する。投票により選出された理事のほかに、理事会が必要と認める者若干名を理事に指名することができる。運営委員は正会員の投票により選出するものとし、選出方法は執行細目により別に定める。理事、運営委員の定数は改選毎に理事会で定める。

何れの役員も任期は3年とする。

第9条 会長は本学会を代表して会務を総括するとともに、理事会ならびに運営委員会を招集しその議長を務める。理事は会長とともに理事会を構成し、本学会の重要事項を審議々決し会務を執行する。監事は本学会の会計業務を監査する。運営委員は理事、監事の選挙権を持ち、会長の委嘱に応じて各種委員会に参加することができる。

第10条 理事会は本学会活動の必要に応じた委員会を設置することができる。委員は運営委員の中から理事会が選出する。

第4章 総会、学術集会

第11条 総会ならびに学術集会は年1回開催する。

第12条 本学会の事業、予算・決算、役員、会則の変更、その他理事会において必要と認めた事項は総会において承認を得るものとする。

第13条 年次総会、学術集会に総会長をおく。総会長は理事会の推薦により会長が委嘱する。

第14条 理事会の議決を経て、必要に応じたシンポジウム、セミナーを適宜開催することができる。

第5章 会則の改訂

第15条 本学会会則を改正するには、理事会の議決を経た後、総会の承認を得るものとする。

附 則

本会則は平成6年7月12日からこれを施行する。

役員選出施行細則

第1条 役員の選出は、会則第8条に規定するものを除き本細則によって施行する。

第2条 役員選出における管理運営は理事会が設置する選挙管理委員会が行う。

第3条 運営委員の選出においては、改選毎に理事会で定める定数以上の候補者名簿を理事会が作成する。正会員2名以上の推薦を受けた正会員が候補者となることができ、このなかから正会員の直接無記名投票により得票上位のものから選出する。

会費ならびに事務局に関する規定

第1条 新入会の際の入会金は1千円とする。

第2条 正会員の年会費は3千円とする。

第3条 賛助会員の年会費は1口3万円とする。

第4条 本学会は事務局を名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1 名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体高分子部門内におく。

附 則

本規定は平成6年7月12日からこれを実施する。

日本生体防衛学会役員

(平成 12 年～14 年)

(会長) 岡田 秀親 (名古屋市立大学)

(理事) 赤川 清子 (国立感染症研究所)

安保 徹 (新潟大学)

小野寺 節 (東京大学)

桂 義元 (京都大学)

木下 夕口ウ (大阪大学)

中村 三千男 (長崎大学)

藤田 禎三 (福島県立医科大学)

光山 正雄 (京都大学)

吉開 泰信 (名古屋大学)

和合 治久 (埼玉医科大学)

道家 紀志 (名古屋大学)

川畑 俊一郎 (九州大学)

(監事) 成内 秀雄 (東京大学)

森 勝義 (東北大学)

運 營 委 員

赤池 孝章	熊本大・医	中西 照幸	日大・生物資源
赤川 清子	国立感染研	中根 明夫	弘前大・医
安保 徹	新潟大・医	中村 三千男	長崎大・熱帯研
上出 利光	北大・免疫研	名倉 宏	東北大・医
内山 竹彦	東女医大	成内 秀雄	東大・医科研
海老名 卓三郎	宮城県がん研	能勢 真人	愛媛大・医
奥田 研爾	横浜市大・医	姫野 国祐	徳島大・医
小野寺 節	東京大・農	藤田 禎三	福島医大
甲斐 智恵子	東大・医科研	古田 恵美子	独協医大
垣内 史堂	東邦大・医	前田 浩	熊本大・医
笠原 忠	共立薬科大	松崎 吾朗	九大・生防研
桂 義元	京大・再生研	水落 次男	東海大・工
神谷 久男	北里大・水産	光山 正雄	京大・医
川上 和義	琉大・医	森 勝義	東北大・農
川畑 俊一郎	九大・理	山崎 正利	帝京大・薬
北 潔	東京大・医	山下 昭	浜松医大
木下 夕口ウ	阪大・微研	山下 優毅	産業医大
熊沢 義雄	北里大・理	山村 雅一	東海大・医
小林 邦彦	北大・医	横沢 英良	北大・薬
島村 忠勝	昭和大・医	吉開 泰信	名大・医
鈴木 和男	国立感染研	吉田 真一	九大・医
多田隈 卓史	防衛医科大	米原 伸	京大・ウィルス研
田中 邦男	日大・医	和合 治久	埼玉医大短大
道家 紀志	名大・農	渡辺 直熙	慈恵医大
内藤 眞	新潟大・医	渡部 久実	新潟大・医

賛 助 会 員

味の素株式会社中央研究所
川崎市川崎区鈴木町 1-1

エーザイ株式会社医薬事業部
東京都文京区小石川 5-5-5

株式会社エスアールエル
八王子ラボラトリー
八王子市小宮町 51

化研生薬株式会社
三鷹市下連雀 3-32-4
グリーンパルコビル 3 階

鐘紡株式会社漢方ヘルスケア研究所
高岡市鐘紡町 3-1

呉羽化学工業株式会社医薬品部
東京都中央区日本橋堀留町 1-9-11

クロレラ工業株式会社
福岡県筑後市久富 1343

株式会社菜根出版
東京都千代田区平河町 1-8-13

三共株式会社第二生物研究所
東京都品川区広町 1-2-58

ゼリア新薬工業株式会社
中央区日本橋小舟町 10-11

武田薬品工業株式会社福岡支店
福岡市博多区下川端町 9-12

中外製薬株式会社臨床業務部
東京都中央区京橋 2-1-9

千代田テクノル株式会社
文京区湯島 1-7-12
千代田お茶の水ビル 6 階

東レ株式会社医薬事業部
東京都中央区日本橋室町 2-2-1

日水製薬株式会社診断薬企画開発部
東京都豊島区巢鴨 2-11-1

藤沢薬品工業株式会社研究推進部
大阪市淀川区加島 2-1-6

富士レビオ株式会社商品開発部
八王子市小宮町 51

明治製菓株式会社薬品総合研究所
横浜市港北区師岡町 760

株式会社ヤクルト本社中央研究所
国立市谷保 1796

和光純薬工業株式会社試薬本部
大阪市中央区道修町 3-1-2

